

無洗米副産物を用いたLactobacillus brevis IFO12005による -アミノ酪酸の生産

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	大友,理宣 保効,美佳 押部,明德 畠,恵司 戸枝,一喜
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	38巻1号
掲載ページ	p. 19-23
発行年月	2012年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



無洗米副産物を用いた *Lactobacillus brevis* IFO12005 による γ -アミノ酪酸の生産

大友理宣^{*1}・保莉美佳^{*2}・押部明徳^{*3}
島 恵司^{*2}・戸枝一喜^{*4§}

* 1 秋田銘醸 (株)

* 2 秋田県総合食品研究センター

* 3 東北農業研究センター

* 4 東京農業大学生産学部食品香粧学科

Production of γ -Aminobutyric Acid from the By-product
of Non-wash Rice by using *Lactobacillus brevis* IFO12005

OHTOMO Masanobu^{*1}, HOKARI Mika^{*2}, OSHIBE Akinori^{*3},
HATA Keishi^{*2} and TOEDA Kazuki^{*4§}

* 1 Akitameijou Co., Ltd., 4-23 Daikumachi, Yuzawa, Akita 012-0814

* 2 Akita Research Institute of Food & Brewing (ARIF), 4-26 Sanuki, Arayamachi, Akita 010-1623

* 3 National Agricultural Research Center for Tohoku Region,
4 Akahira, Shimo-kuriyagawa, Morioka, Iwate 020-0198

* 4 Department of Food and Cosmetic Science, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture,
196 Yasaka, Abashiri, Hokkaido 099-2493

The efficiency of a technique for the production of γ -aminobutyric acid (GABA) by using *Lactobacillus brevis* IFO12005 and the by-product of non-wash rice (NWRB) was evaluated. The rate of conversion of monosodium glutamate (MSG) to GABA by the IFO12005 strain using NWRB (NWRB:water=1:3) was low (26%). Enzyme processing of NWRB (enzyme-processed NWRB) when NWRB was the sole source of nutrition was very effective for GABA production. When the MSG of 24% for NWRB was added to enzyme-processed NWRB medium (NWRB:water=1:8), all the MSG was converted to GABA (13.8mg/g) by the IFO12005 strain. GABA at a concentration of 16.1mg/g was obtained with a conversion rate of 97% by using a 30- ℓ jar fermentor containing 20kg of enzyme-processed NWRB medium.

(Received Jul. 20, 2011; Accepted Oct. 13, 2011)

Key words: γ -aminobutyric acid (GABA), non-wash rice, *Lactobacillus brevis* IFO12005
 γ -アミノ酪酸, 無洗米, *Lactobacillus brevis* IFO12005

無洗米は米を洗わないで炊飯できる利便性のほか、洗米による排水汚染の制御などの面から消費が急速に拡大している。現在、市場に出回っている無洗米としてはSJ無洗米¹⁾、TWR無洗米²⁾、BG無洗米³⁾などがある。SJ無洗米は、普通精米に水を加えて精米同士をこすりあわせて糠を除去し、その後乾燥し、製造したものである。TWR無洗米は加熱したタピオカデンプンを使用して糠を取り除くことによって製造されたものである。BG無洗米は

糠を使用して糠を取り除くBran Grind製法で製造されたものである。無洗米の製造工程で1-2%の糠を主体とした副産物が副生する。無洗米副産物の一部は肥料等に利用されているが、低利用な副産物である。利用研究としては無洗米副産物の反すう動物に対する飼料特性⁴⁾の報告があるが、研究例は少ない。無洗米副産物には糖質、タンパク質、繊維などの栄養成分が多く含まれているため発酵原料として有望であるが、現状は十分に活用

* 1 〒012-0814 秋田県湯沢市大工町4-23

* 2 〒010-1623 秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4-26

* 3 〒020-0198 岩手県盛岡市下厨川字赤平4

* 4 〒099-2493 北海道網走市八坂196

§ Corresponding author, E-mail: k3toeda@bioindustry.nodai.ac.jp

されていない。

一方、 γ -アミノ酪酸 (GABA) は血圧降下作用⁵⁾、精神安定作用⁶⁾、急性腎不全に対する防護効果⁷⁾をもつことが知られている。GABA生産については米胚芽、茶や微生物などの内在グルタミン酸脱炭酸酵素⁸⁾を利用してGABAを富化した食品素材が報告されている^{9)~10)}。乳酸菌によるGABA富化食品素材^{11)~15)}が報告されているが、無洗米副産物を発酵原料としGABAを富化させる研究報告はない。

筆者ら¹⁴⁾は米糠を唯一の栄養源とした酵素処理米糠培地を用い、乳酸菌*Lactobacillus brevis* IFO12005によりグルタミン酸からGABAを1.4% (w/w) 生産できることを報告した。本報では、無洗米副産物を唯一の栄養素とした培地を調製し、IFO12005を用いた発酵によるGABA含有組成物の生産を目的とした。無洗米副産物の前処理法および培養条件を検討した結果、グルタミン酸からGABAへの高い変換効率を保持し、GABA濃度が16.1mg/gのGABA含有組成物の生産法を開発したので報告する。

実験方法

1. 実験試料

試料は大潟村カンントリーエレベータ公社において、BG無洗米機 (東洋精米機製作所製)⁹⁾による製造工程で副生する無洗米副産物 (by-product of non-wash rice: NWRB, Table 1) を用いた。グルタミン酸モノナトリウム・一水和の特級 (MSG, 和光純薬工業製) を用いた。

2. アミノ酸分析

試料液1.0gに40%トリクロロ酢酸0.25mLを添加後、遠心分離 (2,900×g, 10分) により除タンパクした。得られた上澄液中のアミノ酸をアミノ酸自動分析機JLC-300 (日本電子製) を用いて分析した。

MSGからGABAへの変換率 (%) は生成したGABAモル濃度を添加MSGモル濃度で除して算出した。

3. 糖分析

NWRBの酵素処理により生成される単糖・オリゴ糖および培養液中の残存する糖はDX-500 (ダイオネクス製) 高性能陰イオン交換クロマトグラフ (HPAEC-PAD) を用いて分析した¹⁶⁾。

Table 1 Composition of NWRB

Component	Content (g/100g)
Moisture	10.0
Crude protein	15.9
Crude fat	14.1
Carbohydrates	51.2
Crude ash	8.8
Dietary fiber	1.9

4. 菌数の測定

乳酸菌は乳酸菌数測定用培地 (BCP加プレートカウントアガール, 日水製薬製) を用いて30℃で3日間培養し、菌数測定した。

5. 乳酸菌培養

GABA生産乳酸菌としてはIFO12005が赤糠を用いることによりMSGからGABAを高生産¹⁴⁾することを確認しているため、IFO12005を実験に供した。なお、IFO 12005は醗酵研究所から入手したものをを用いた。現在、当該株はNBRC12005として入手可能である。保存にはMRS培地 (Difco製) を用いた。前培養培地は、1%MSGを含むGY液体培地 [グルコース2%, 酵母エキス1% (酵母味, 武田キリン食品製)] を用い、30℃, 2日間回転振とう培養 (200rpm) した。

培養液は90%乳酸にてpH4.5に調整後、加圧滅菌 (121℃, 15分) し、前培養液を培地に対し5% (v/w) 接種後、30℃で所定時間回転振とう培養 (200rpm) した。経時的にGABA, グルタミン酸濃度を測定した。

6. 酵素処理NWRBの調製

NWRB250g, 水750mL [加水割合3倍 (NWRBに対して)] の混合液を90%乳酸にてpH4.5に調整し、市販酵素剤の液化アミラーゼ酵素剤YA (天野製薬製), 蛋白分解酵素剤デナブシン10P (ナガセケムテック製), 繊維分解酵素剤ペクチナーゼナガセ (ナガセケムテック製) をNWRB重量に対してそれぞれを1/1,000加え、攪拌しながら酵素処理した。酵素処理は、40℃ (60分) →40~55℃ (30分) →55℃ (60分) →55~100℃ (60分) →100℃ (10分) →100~40℃ (50分) の条件で実施した。本法により得られた酵素処理液を酵素処理NWRBとした。

7. 酵素処理NWRBによるGABAの調製

(1) NWRBおよび酵素処理NWRBによるGABA生産
NWRB 5g, 水15mLの混合液および酵素処理NWRB (NWRB 5g相当量) 20gを加圧滅菌 (121℃, 15分) した。それぞれの混合溶液に別途滅菌したMSGを加え、グルタミン酸の終濃度は1.59% (w/w) とした。

(2) 酵素処理NWRBによるGABA生産における加水の影響
酵素処理NWRBの最適濃度を調べるために、NWRBと水の比は、1:4, 1:6, 1:8に設定した。酵素処理NWRB60g (NWRBとして20g) に、それぞれ水を15mL (1:4), 45mL (1:6) および75mL (1:8) 加えた。1:4, 1:6, 1:8の各試験区のグルタミン酸終濃度は1.55, 1.12および0.68% (w/w) とした。

(3) 酵素処理NWRBによるGABA高生産条件の検討
酵素処理NWRB 8g (NWRB 2g含有) を水8mLで加水 (NWRB:水=1:7) したものに、MSGをNWRB重量に対して8, 16, 24, 32, 40% (w/w) に相当する量を添加した。各試験区のグルタミン酸終濃度はそれぞれ0.71, 1.40, 2.10, 2.80, 3.51% (w/w) とした。

8. GABA含有組成物の30ℓジャー生産試験

30ℓジャー培養装置MSJ-N 2型(丸菱バイオエンジニアリング)にpH4.5に調整した酵素処理NWRB(NWRBとして2.5kg)を加熱滅菌(121℃, 15分)した。別途滅菌したMSGを加え, グルタミン酸終濃度は2.36%(w/w)とした。なお, NWRBと水の比は, 1:7とした。培養は30℃, 200rpmで行った。

実験結果および考察

1. NWRBおよび酵素処理NWRBによるGABA生産

NWRBおよび酵素処理NWRBを用い, IFO12005による培養4日後のGABAの生成量をTable 2に示した。NWRBではGABA生成濃度(変換率)は2.8mg/g(25.7%)であり, 未変換のグルタミン酸が14.8mg/gであったが, 酵素処理NWRBを用いた場合, 培養4日目で10.8mg/g(98.7%)のGABAが生産された。NWRBでのGABAの低い生産性の原因として栄養源の不足が考えられる。Table 3に酵素処理NWRBの培地中の糖組成および培養4日後の培養液中の糖組成を示した。NWRBには糖として, イソマルトースのみが8.7mg/g含まれていたが, 酵素処理することによりグルコース, イソマルトース, マルトースおよびマルトトリオースが2.3~13.6mg/gに増加した。これはNWRB中の澱粉が酵素処理により生成したものと考えられる。赤糠の酵素処理によりグルコース, マルトースの増加¹⁰⁾が認められているが, 酵素処理NWRBにも同様に認められた。培養4日後にはグルコースが完全に消費され, マルトースも著しく消費された。以上のことから酵素処理により生成したグルコース, マルトースが乳酸菌の栄養源となった結果, 菌体増殖が起こり, GABAが高生産されたものと考えられる。赤糠のプロテアーゼ処理により, 総遊離アミノ酸量が2倍に増加することを認めている¹⁰⁾。今回, 酵素処理NWRB中のアミノ酸は測定していないが, 用いた酵

Table 2 Effect of enzyme processing of NWRB

Enzyme processing	mg/g		GABA conversion rate (%)
	Glu	GABA	
-	14.8	2.8	25.7
+	0.2	10.8	98.7

Glutamic acid and IFO12005 were added to NWRB enzyme processed NWRB liquid mixture and cultivated for 4 d at 30℃.

Table 3 Sugar-composition in medium of enzyme-processed NWRB

Culture time (d)	mg/g			
	Glucose	Isomaltose	Maltose	Maltotriose
0	2.3	10.5	12.6	13.6
4	0	8.2	1.6	11.8

素剤はプロテアーゼも含まれていることから増加したアミノ酸も栄養源になったものと考えられる。しかし, 酵素処理NWRB中のグルタミン酸は0.01mg/g以下であり, MSG添加量に比べ無視できる濃度と考えられる。

2. GABA生産における酵素処理NWRBの加水割合の影響

培養に伴うMSGからGABAへの変換率をFig. 1に示した。試験区1:4(NWRB:水)の培養1日目ではGABAが1.7mg/g生成し, 変換率19.3%(w/w)と低い値となったが, 試験区1:6および1:8では, GABAがそれぞれ5.7, 4.7mg/g生成し, 95%以上の高い変換率であった。試験区1:4での低いGABA生産の原因としては菌の生育不良が考えられる。IFO12005によるGABAの高生産には10⁸cfu/ml以上の菌体量が必要であることがわかっている¹⁰⁾。本試験では生菌数は測定していないが, 加水割合が低い場合, 糖濃度が高すぎるためにグルコースによるカタボライト制御による菌の生育の遅れが原因として考えられる。

3. 酵素処理NWRBによるGABA高生産条件の検討

NWRB重量に対し8~40%(w/w)のMSGを添加した試験区の培養5日後のGABA生成結果をFig. 2に示した。8, 16, 24%の各試験区のGABA濃度と変換率はそれぞれ4.4mg/g(変換率:100%), 8.9mg/g(97.3%), 13.8mg/g(100%)であり, MSG添加濃度に伴いGABA濃度も増加した。しかし, 32%区, 40%区のGABA濃度(変換率)はそれぞれ15.6mg/g(84.2%), 18.5mg/g(80.7%)であり, GABAの濃度

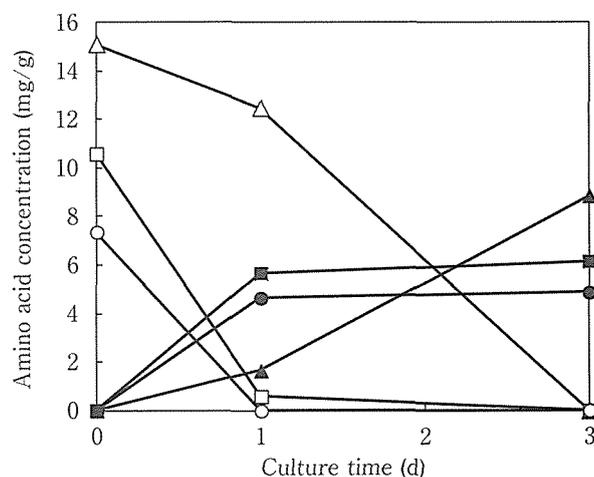


Fig. 1 Effect of ratio of NWRB and water in enzyme-processed NWRB medium on production of GABA

The enzyme-processed NWRB medium was cultivated for 4 d at 30℃ with addition of glutamic acid and IFO12005 to alter hydration rate.

Symbols for GABA: GABA concentration: NWRB: water = 1:4 (—▲—), NWRB: water = 1:6 (—●—), NWRB: water = 1:8 (—■—); symbols for glutamic acid: NWRB: water = 1:4 (—△—), NWRB: water = 1:6 (—○—), NWRB: water = 1:8 (—□—)

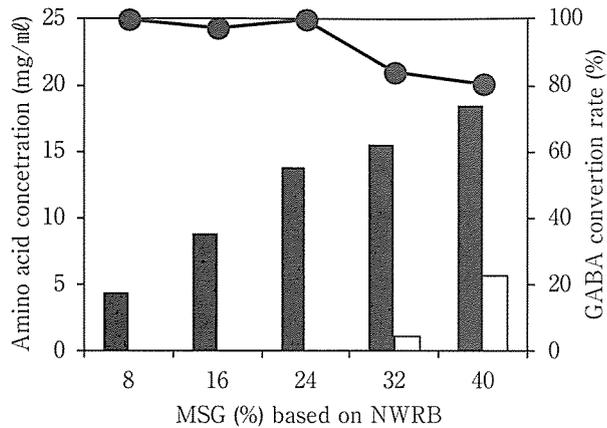


Fig. 2 Effect of MSG concentration on production of GABA using enzyme-processed NWRB medium

An 8% to 40% of MSG based on NWRB and IFO12005 were added to the enzyme-processed NWRB, which was cultivated for 5 d at 30°C.

Symbols for GABA conversion rate ; (—●—), GABA (■), Glutamic acid (□)

が高くなったが未変換のMSGも増加した。24%添加区では添加したMSGすべてが変換され、13.8mg/gのGABAが生成した。早川ら¹³⁾はIFO12005を用いたGYP培地により、1%のMSGからGABAが5.16mg/g生成したことを確認している。また、筆者ら¹⁴⁾もIFO12005を用いた酵素処理赤糠により、14.1mg/gのGABAの生成を報告した。以上のことから、GABA生産において酵素処理NWRBはGYP培地より優れており、酵素処理赤糠と同程度以上のGABA生産性があることがわかった。

4. GABA含有組成物の30ℓジャー生産試験

30ℓジャー培養装置を使用し、NWRB2.5kgスケールのGABA生産(35°C, 40時間)についてFig.3に示した。MSGからGABA変換率は、培養20時間で51%に達し、GABAの濃度も8.49mg/gとなり、培養40時間には添加したMSGはすべてGABAに変換され、生産濃度として16.1mg/gに達した。IFO12005の菌体増殖においても、培養24時間まで急激に増殖し、40時間後には最大菌体数 2×10^9 cfu/mlに達した。本結果からジャー培養では酵素処理赤糠を超えるGABA生産性があることがわかった。上野ら¹⁵⁾は*Lactobacillus* sp. L13を用いてGYP培地のpHを5に制御することにより、グルタミン酸からGABAを6.7%生産できることを報告した。本実験では、pH制御を行っていないため、pH制御を含むジャー培養の条件を最適化することにより、GABA高生産性が期待できる。

得られた液体および固形分を含む濾過残渣のGABA含有濃度および重量は、それぞれ液体16.3mg/g、18.3kgおよび濾過残渣20.6mg/g、2.68kgであった。以上の結果から、本法を用いることによりGABA含有組成物として液体および濾過残渣(固体)の生産が可能と判断され、食品副産物のNWRBを用いて廃棄物を出すことなくGABA生産が可能となった。また、GABAを含有した酵

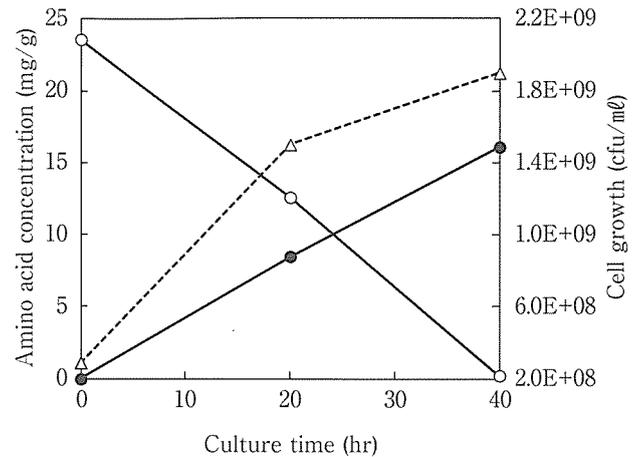


Fig. 3 Production of GABA from enzyme-processed NWRB medium using 30-ℓ jar fermentor

The enzyme-processed NWRB medium was cultivated at 200 rpm at 30°C for 40 h.

Symbols for GABA (—●—), glutamic acid (—○—), cell growth of IFO 12005 (—△—)

素処理赤糠の培養液では、固液分離しないで、そのまま乾燥することにより家畜およびペットフード用に利用できることから、酵素処理NWRBの培養液も同様に飼料などに利用可能と思われる。

今回、実験材料としたBG無洗米製造時のNWRBは、平均粒径は29μmと非常に細かいことから、固形分を含むもろみおよび濾過残渣を微粉砕することなく食品に利用可能である。また、SJR方式およびNTWP方式を用いた無洗米製造時に発生する無洗米副産物もNWRBと成分組成が似ていると考えられるため、本法によるGABA生産が可能と思われる。

要 約

Lactobacillus brevis IFO12005および無洗米副産物(NWRB)を用いてγ-アミノ酪酸(GABA)の効率的な生産法を検討した。NWRBを唯一の炭素源としてIFO12005を用いた乳酸発酵によるグルタミン酸(MSG)からのGABA生成量(変換率)は2.8mg/g(25.7%)と低かった。そこで、NWRB[加水割合3倍(NWRBに対して)]を酵素処理することで、IFO12005の発酵に必要な栄養素である(少糖, アミノ酸)を増量した酵素処理NWRBを開発した。酵素処理NWRBを用いたIFO12005によるGABA生成量(変換率)は10.8mg/g(98.7%)と著しく改善されたが、培養は4日間を要した。酵素処理NWRBの加水割合を無洗米粕重量の4倍から6~8倍に増加させることで、GABA変換率91%以上で培養期間が1日に短縮された。さらに、7倍加水した酵素処理NWRBにおけるさらなるGABA高生産性を検討した。結果、NWRB重量に対しMSG(w/w)を8~24%添加区では、GABA変換率は97%以上であり、24%区ではGABAが13.8mg/g生産された。30ℓジャー培養装置に

よる酵素処理NWRB20kgスケールの培養により97%のGABA変換率で16.1mg/gのGABA含有組成物を製造することができた。

謝 辞 本研究は農林水産省委託プロジェクト「農林水産バイオリサイクル研究」(平成17~18年度)の助成により行われたものである。

文 献

- 1) 柴田恒彦・河野征弘：我が社の無洗米設備，その開発と普及，—スーパージフライス設備—，*ジャパンフードサイエンス*，**37**(8)，39~43 (1998)
- 2) 金本繁晴・柴田恒彦：無洗米—新しい無洗米化处理装置 (NTWP) の開発—，*日本食生活学会誌*，**13**，2~9 (2002)
- 3) 雑賀慶二：米のとぎ汁公害とBG無洗米の開発，*ジャパンフードサイエンス*，**37**(8)，33~38 (1998)
- 4) 永西 修・川島知之：無洗米製造副産物の第一胃内消化特性と栄養価，*Grassl. Sci.*，**49**，471~476 (2003)
- 5) STANTON, H. C.: Mode of action of gamma aminobutyric acid on the cardiovascular system, *Arch.Int.Pharmacodyn.*，**143**，195~204 (1963)
- 6) 岡田忠司・杉下朋子・村上太郎・村井弘道・三枝貴代・堀野俊郎・小野田明彦・梶本修身・高橋 励・高橋丈夫： γ -アミノ酪酸蓄積脱脂コメ胚芽の経口投与における更年期障害及び初老期精神障害に対する効果，*日食工誌*，**47**，596~603 (2000)
- 7) KIM, H. Y., YOKOZAWA, T., NAKAGAWA, T. and SASAKI, S.: Protective effect of gamma -aminobutyric acid against glycerol-induced acute renal failure in rats, *Food & Chem. Toxicol.*，**42**，2009~2014 (2004)
- 8) UENO, Y., HAYAKAWA, K., TAKAHASHI, S. and ODA, K., Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO12005, *Biosci. Biotech. Biochem.*，**61**，1168~1171 (1997)
- 9) 津志田籐二郎・村井敏信・大森正司・岡本順子： γ -アミノ酪酸を蓄積させた茶の製造とその特徴の分析，*農化*，**61**，183~187 (1988)
- 10) SAIKUSA, T., HORINO, T. and MORI, Y.: Distribution of free amino acid in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution, *J. Agric. Food Chem.*，**42**，1122~1125 (1994)
- 11) KONO, I. and HIMENO, K.: Changes in γ -aminobutyric acid content during beni-koji making, *Biosci. Biotech. Biochem.*，**64**，617~619 (2000)
- 12) YOKOYAMA, S., HIRAMATSU, J. and HAYAKAWA, K.: Production of γ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO12005, *J. Biosci. and Bioeng.*，**93**，95~97 (2002)
- 13) 早川 潔・上野義栄・河村眞也・谷口良三・小田耕平：乳酸菌による γ -アミノ酪酸の生産，*生物工程*，**75**，239~244 (1997)
- 14) 大友理宣・木村貴一・渡辺誠衛・戸枝一喜：米糠を用いた*Lactobacillus brevis* IFO12005による γ -アミノ酪酸含有組成物の生産，*生物工程*，**84**，479~483 (2006)
- 15) 上野義栄・平賀和三・森 義治・小田耕平：漬物から γ -アミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌の分離と応用，*生物工程*，**85**，109~114 (2007)
- 16) 渡辺隆幸・保莉美佳・戸枝一喜・伊藤英晃：秋田味噌のイソマルトースとグルコースの比率，*味噌の科学と技術*，**56**，291~294 (2008)

(平成23年7月20日受付，平成23年10月13日受理)