

# 米糠を用いた - アミノ酪酸含有発酵素材の生産とその実用化

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	大友,理宣
発行元	日本醸造協会
巻/号	105巻9号
掲載ページ	p. 583-590
発行年月	2010年9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



# 米糠を用いた $\gamma$ -アミノ酪酸含有発酵素材の生産とその実用化

食用米の精米時や清酒製造工程において、大量の米糠が副産物として排出されているが、米糠油、飼料、肥料等以外の有効利用が少なく、大きな問題となっている。そこで、著者は現行の清酒製造設備を活用して、米糠を複合酵素処理後、基質としてグルタミン酸を添加した培地で、乳酸菌 *Lactobacillus brevis* IFO12005 を培養して、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 含有米糠発酵素材の実用化に成功している。さらに、この GABA 含有素材に高血圧自然発症ラットに対して、有意差はないが血圧降下傾向を、マウスに対して、脂質代謝改善効果作用を確認しているのを、解説いただいた。

大友理宣

## 1. はじめに

私達が普段食している食用米の精米時や清酒製造工程において、大量の米糠が排出されている。しかし、この食品副産物である米糠は、米糠油、飼料原料、堆肥等の用途以外の有効利用がなく、重要な問題とされている。また、米糠には良質な油脂、タンパク質、ビタミン、食物繊維等の機能性成分が豊富に含まれ発酵原料や機能性素材として有望であるが十分に活用されていない現状である。

一方、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は動植物界<sup>1)</sup>に広く分布し、血圧降下作用<sup>2)</sup>、精神安定作用<sup>3)</sup>、脂質代謝改善作用等<sup>4)</sup>について報告されている。植物では米胚芽、米糠、米や茶葉などの内在グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) を利用し GABA を富化した食品素材やその生理機能<sup>5-10)</sup>について、微生物では乳酸菌、酵母などの液体発酵による GABA 富化食品素材<sup>11,12)</sup>について報告されている。しかしながら、米糠を発酵原料に GABA を富化させる研究についての報告はない。

さらに、清酒需要が激減し、醸造設備の休眠期間が長期化していることから、醸造設備の有効利用を目的とし、米糠を唯一の栄養素培地とした乳酸菌 *Lactobacillus brevis* IFO12005 (現 NBRC12005) の発酵による GABA 含有組成物の生産技術の開発<sup>13)</sup>と機能性評

価及び実用化について報告する。

## 2. 米糠の発酵原料への影響と GABA 生産性

原料として用いる米糠には  $10^7$ cfu/ml 程度の菌が存在する。将来的に、本研究成果の実施規模生産を想定した場合、米糠と水の混合液の滅菌方法は重要な課題であった。そこで、米糠 20g、水 80g の米糠混合液を 90% (w/v) 乳酸で pH4.5 以下に調整し、100℃、30 分間の常圧滅菌による一般生菌数 10cfu/ml 以下にする滅菌方法を確立した。

次に、米糠混合液に乳酸菌 *Lactobacillus brevis* IFO12005 を 0.8% (w/w) と 1.5% (w/w) グルタミン酸モノナトリウム・一水和物 (MSG) を加え、30℃で4日間培養による GABA 生産 0.86% (w/w)、MSG から GABA への変換率 79.7%を確認した (第1図)。また、米糠混合液に対する MSG の限界添加量は 1.5% (w/w) であった。

一方、品種の異なる米糠を用いた GABA 生産試験では、各試験区の米糠混合液で GABA 生産 0.8% (w/w) 以上を確認し、米糠の品種間の差による GABA 生産性に影響が無いことが判明した。このことから、米糠を唯一の栄養源培地とした乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 の発酵による GABA 生産を可能とした。さらに、米糠品種の違いによる GABA 生産性に影響

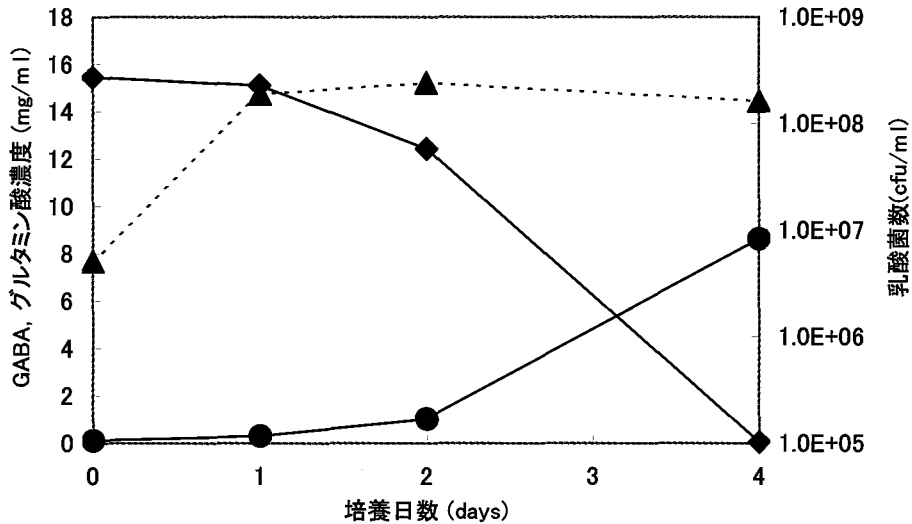
Production and Practical Use of Fermented Rice Bran Containde  $\gamma$ -Aminobutric Acid  
Masanobu OHTOMO (Laboratory manager, Manufacturing Department, AKITAMEIJO CO., LTD)

がないことを確認した。

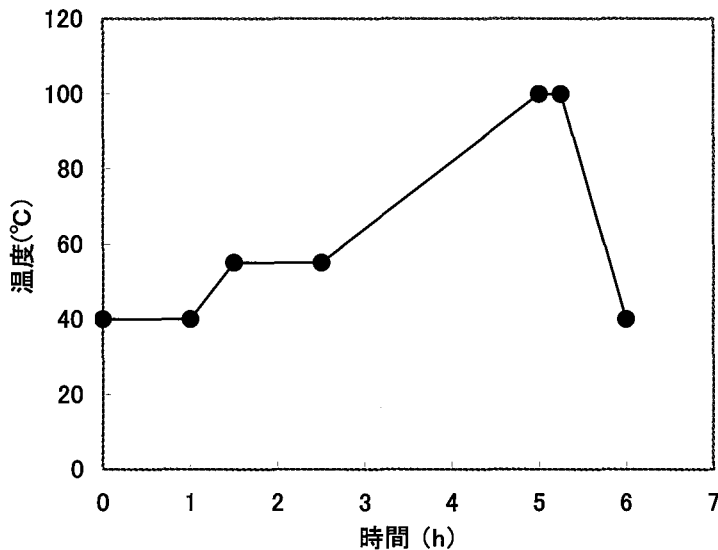
### 3. 米糠培地の開発と発酵条件による GABA 生産の影響

上述の米糠混合液を用いた乳酸菌発酵法において、GABA 生産濃度が低い原因は、米糠混合液中の栄養

源不足が推測される。そこで、90% (w/v) 乳酸で pH4.4 に調整した米糠混合液に対して、 $\alpha$ -アミラーゼ、酸性プロテアーゼ、パクチナーゼの複合酵素を 0.01% (w/w) 加え、酵素処理方法を検討した。第 2 図に示した酵素プログラム法によって、米糠混合液中の遊離アミノ酸総量が 0.9mg/g から 2.5mg/g、炭素



第 1 図 米糠混合液を用いた *L.brevis* IFO12005 による GABA 生産  
米糠混合液(米糠：水 = 1：4)に乳酸菌 *L.brevis* IFO12005 を摂取し、30℃、6 日間培養をした。  
●：GABA, ▲：グルタミン酸, ■：乳酸菌数



第 2 図 米糠培地における酵素プログラム

源が12.3mg/gから17.0mg/gに増加した。中でも本菌が利用可能なグルコース、フラクトース、マルトース等の炭素源が増加した。以上から、米糠混合液をpH4.5以下に調整し、酵素処理したGABA生産用米糠培地の開発に成功した。

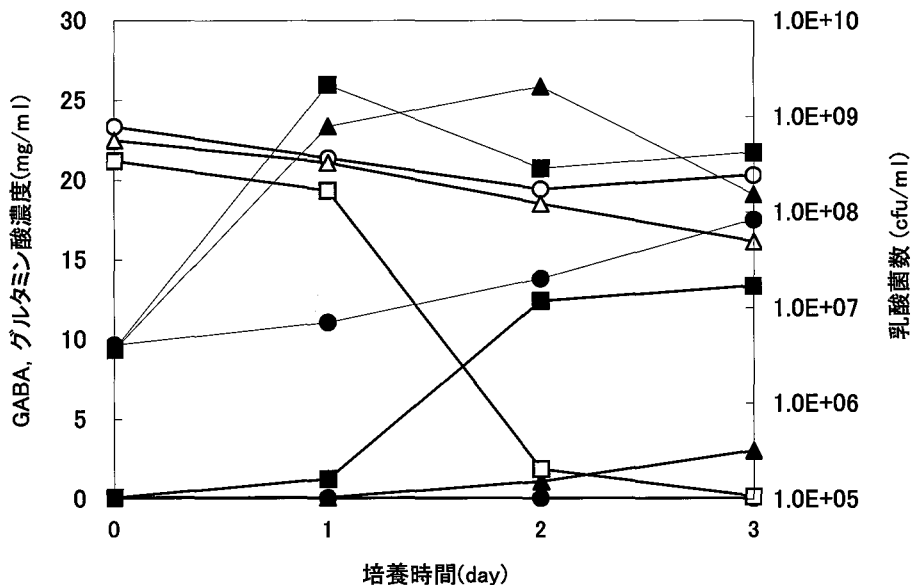
次に、開発した米糠培地の配合割合(米糠:水)を1:4~1:6に設定し、乳酸菌 *Lactobacillus brevis* IFO12005 による GABA 変換率、生産性および乳酸菌数を測定した。配合率1:5以上の米糠培地では配合率1:4米糠培地に比べ、早い培養日数(培養2日目)で高いGABA変換率(83~86%)を達した。また、乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 の増殖速度が、1:4米糠培地に比べ最大乳酸菌が1.5倍と高い増殖率であった。これは、米糠の酵素処理による炭素源、アミノ酸等の栄養源増加および配合率の加水比率増加による米糠培地中の粘性低下、攪拌培養効率の上昇によるGABA変換速度や菌体増殖を促されたものと推測される。

次に米糠培地(配合率1:6)に対してMSG1.2%(w/w)、1.6%(w/w)、2.2%(w/w)を添加し、MSG添加量の違いによるGABA生産性、変換率等の

影響を検討した。MSG1.6%、2.2%添加区では、培養1日目にGABA生産0.8%(w/w)、1.1%(w/w)を確認し、両試験区ともGABA変換率95%以上であった。これは、米糠培地に対するMSG添加量による培地pH増加の影響によって、*L. brevis* IFO12005の生育条件が旺盛となり、結果MSGからGABAへの変換率が向上したと考えられる。

そこで、米糠培地の初発pHの影響による *L. brevis* IFO12005 のGABA生産性について検討した。GABAの生成に関与する *L. brevis* IFO12005 のGADの至適pHは4.2と報告<sup>14,15)</sup>されている。そこで、米糠20gと水120gをpH4.4に調整し、酵素処理(複合酵素)した米糠培地にMSG2.2%(w/w)加え、1N塩酸溶液でpH4.0、pH4.7、pH5.3に調整し、0.5%(w/v)の *L. brevis* IFO12005 を接種し30℃、3日間の静置培養を行った。

各試験区の経時変化は第3図に示した通り。米糠培地の初発pH4.0試験区では、培養3日間でのGABA生産は確認されなかった。また、培養3日目のpH4.7試験区ではGABA生産0.3%(w/w)、変換率19.2%、pH5.3試験区ではGABA生産1.3%(w/w)、変換率



第3図 初発pHの異なる米糠培地におけるGABA生産の影響  
GABA濃度 pH4.0(—●—), pH4.7(—▲—), pH5.3(—■—); グルタミン酸濃度 pH4.0(—○—), pH4.7(—△—), pH5.3(—□—); 乳酸菌数 pH4.0(—●—), pH4.7(—▲—), pH5.3(—■—)

90%であった。このことから、MSG添加後の米糠培地における初発 pH は 4.7 以上が必要であり、且つ *L. brevis* IFO12005 の菌体増殖による菌体定常期に移行しても GABA 生産は抑制されることが推測された。

#### 4. 米糠による GABA 含有発酵素材の生産

実施規模を想定した 30l ジャー培養装置を用いた米糠培地 20 kg スケール（米糠 4 kg, 水 16 l）での GABA の生産試験を行った。尚、現場製造想定し、乳酸で pH4.4 に調整した米糠混合液を 100℃、30 分間の加熱殺菌、酵素処理による米糠培地の製造後、1.7% (w/w) MSG と 3.7% (w/v) *L. brevis* IFO12005 前培養液を加え、30℃で 7 日間の攪拌培養（50rpm）を行った。

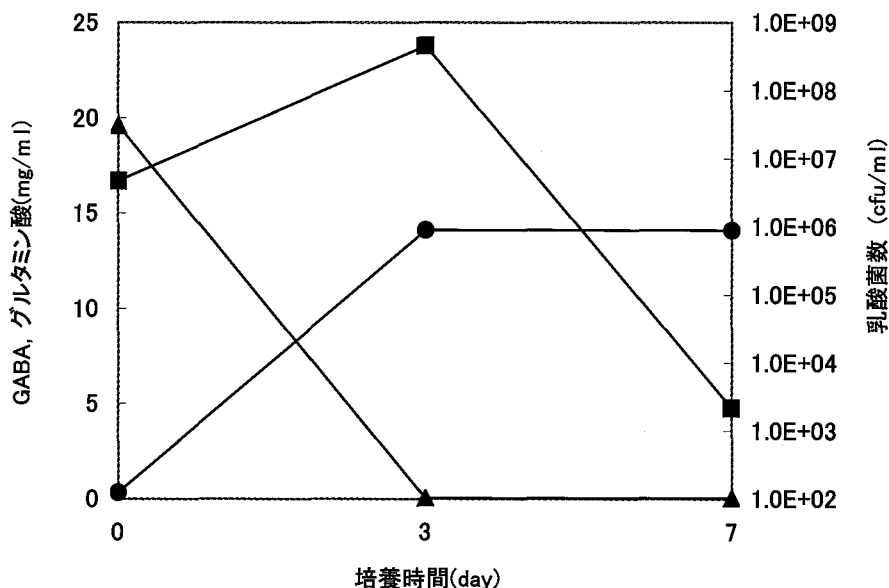
加熱殺菌後における米糠培地の一般生菌数（AC プレート；3M 社製）が確認できなかったことから、現場規模の清酒製造装置を活用した米糠培地の製造に期待が持てた。さらに、第 4 図より培養 3 日間で GABA 濃度 1.4% (w/w)、変換率 95%、菌体増殖は  $4.6 \times 10^8$  cfu/ml の最大に達した。その後、圧搾機 MO-4 型（薮田産業製）による米糠培地の固液分離を検討したが、米糠培地の粘性、ろ布の目詰まり等から圧搾機内内圧上昇の影響による連続液体の採取が不可

能であった。そこで、培養終了後の米糠培地に 0.01% (w/w) 糖化酵素剤を加え、55℃で 1 時間の酵素処理後に固液分離を検討した結果、連続濾過を可能し 65.6% (w/w) 液体収率を確認した。本液体収率は、遠心分離法（3000rpm, 50 分）の液体収率 65.2% (w/w) と同等であることから、現場規模の清酒製造装置を活用した生産の期待が持てた。また、得られた液体および濾過残渣の GABA 濃度は液体 1.3% (w/v)、濾過残渣 1.2% (w/w) であったことから、GABA 含有組成物として液体・固体の生産を可能とした。本法を用いることで、食品副産物の米糠を用いて廃棄物を排出しない GABA 生産技術の開発に成功した。

#### 5. 米糠発酵素材の機能性

##### 5. 1 高血圧自然発症ラット動物試験

米糠発酵液の血圧に与える影響を検討するため、12 週齢雌性本態性高血圧自然発症ラット（SHR；三共ラボサービス）を用い、市販の固形飼料（オリエンタル酵母工業㈱）MF 飼料（10 個/日）と飲用水を 6 週間の自由摂取による予備飼育した後、各試験飼料をゾンテで経口投与し、実験開始時から投与後 5 時間までの収縮血圧を 1 時間ごとに測定した。各試験飼料は、試験群が 1% 米糠発酵液（GABA10mg）、標準品



第 4 図 30l ジャー培養装置による GABA 生産

●：GABA, ▲：グルタミン酸, ■：乳酸菌数

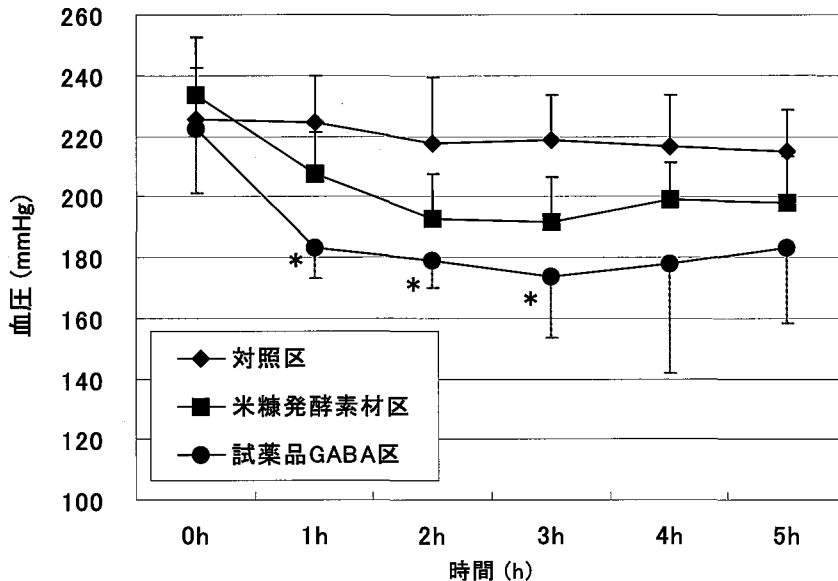
GABA (GABA10mg), さらに対照群が生理食塩水 (対照区) とした。

経時変化を第5図に示した。1%米糠発酵液では投与1~2時間後に緩やかな血圧降下傾向を確認したが、対照群との間に有意差は認められなかった。一方、標準品GABAは対照群と1~3時間で有意差を認めた。吉澤ら<sup>16)</sup>は、0.002%試薬GABA投与群および5%冷蔵米糠投与群でのSHRに対して有意な血圧上昇抑制効果を報告し、米糠含有の血圧降下物質のひとつはGABAであるが、長期にわたる血圧降下作用には他物質との共存作用を示唆している。本試験ではSHRに対する単回投与であるが、標準品GABAが対照群に対して最も有意な血圧降下作用が認められた。以上から、同濃度のGABAを投与したにも関わらず、1%米糠発酵液は穏やかな血圧降下傾向を示したことから、米糠発酵液中にはSHRの血圧降下に対する何らかの阻害因子が存在する可能性が示めされた。

## 5. 2 マウスの脂質代謝改善効果

C57BL/6 マウス (6 週齢, ♂) に凍結乾燥した米糠発酵素材を1% (w/w) 添加した高脂肪食 (High Fat Diet 32) を2週間給与後、体重、臓器重量の測定を行った。血液中脂質成分 (中性脂肪およびコレステロ

ール) は、ゲル濾過HPLCで4種のリポタンパク質 (キロミクロン; CM, 超低密度リポタンパク質; VLDL, 低密度リポタンパク質; LDL, 高密度リポタンパク質; HDL) に分離後、オンライン酵素法で定量した (LipoSEARCH<sup>®</sup>)<sup>17)</sup>。結果を第1表に示す。無添加の高脂肪食区と比較して、1% (w/w) 米糠発酵素材区における高脂肪食給与マウスの体重、臓器重量に影響を及ぼさなかったが、高脂肪食のみを給与したマウスの血中総中性脂肪値が  $68.6 \pm 14.7 \text{ mg/dl}$  に対し、1%米糠発酵素材添加区では  $30.2 \pm 4.1 \text{ mg/dl}$  と有意に減少した ( $p < 0.01$ )。米糠発酵素材添加区では、肝臓より分泌されるVLDL-リポタンパク質中のコレステロール値においても、無添加区に比べ有意な差 ( $p < 0.01$ ) を示した。さらに、無添加区と比較して、米糠発酵素材添加区の高脂肪食給与マウス LDL 及びVLDL-リポタンパク質中の中性脂肪値 (悪玉中性脂肪) で顕著な有意差を確認した。しかしながら、善玉リポタンパク質と呼ばれるHDL-リポタンパク質中のコレステロールならびに中性脂肪値に変化がなかったことから、米糠発酵素材は中性脂肪等の改善効果が期待される。



第5図 SHRにおける米糠発酵素材の単回給与による血圧変化

◆ : 対照区(無添加), ■ : 米糠発酵素材添加区(GABA 濃度 10mg), ● : 試薬品GABA区(GABA 濃度 10mg), \* $p < 0.05$

第1表 米糠発酵液の高脂肪食負荷マウスに対する影響

	対照区	1.0% (W/W) 米糠発酵素材区
体重 (g)	26.8 ± 0.5	26.2 ± 1.4
肝臓重量 (mg)	1006 ± 43	1004 ± 81
腎臓重量 (mg)	166 ± 31	157 ± 16
脾臓重量 (mg)	80 ± 21	70 ± 11
脂肪組織重量 (mg)		
腸間膜周囲	231 ± 50	178 ± 79
精巣周囲	290 ± 101	248 ± 127
血中コレステロール濃度 (mg/dl)		
総コレステロール	122.2 ± 9.8	125.8 ± 9.8
CM	0	0.1 ± 0.1
VLDL	3.7 ± 0.8	1.5 ± 0.3**
LDL	14.1 ± 4.8	14.0 ± 4.2
HDL	104.3 ± 19.1	110.3 ± 6.7
血中中性脂肪濃度 (mg/dl)		
総中性脂肪	68.6 ± 14.7	30.2 ± 4.1**
CM	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2
VLDL	52.9 ± 12.7	17.7 ± 12.7**
LDL	12.4 ± 1.6	9.4 ± 1.7**
HDL	3.1 ± 0.8	2.8 ± 0.5

\*\*p < 0.01

## 6. GABA 含有素材を用いた試作試験と実用化

清酒製造装置を活用し、上述の開発製法による GABA 含有米糠発酵素材の生産、製品化に成功した。GABA 含有米糠発酵素材の一般成分を第2表に示した。

さらに、本素材を配合した各加工食品（レトルト、飲料、パン、麺等）の試作試験による嗜好性及び GABA 残存率の評価試験を行った。各加工食品に米糠発酵素材を 5% (w/w) 程度配合した。レトルト食品試験（殺菌条件：115℃、30分）では、GABA 残存率 93.6% (w/w)、嗜好性は良好であった。飲料試験（殺菌条件：85℃、30分）、パン試作試験での GABA 減少は確認されず、嗜好性も問題はなかった。しかしながら、麺試作試験（うどん、そば）では製造工程における GABA 減少は未確認であるが、茹でた際に茹で汁に 50% 程度 GABA を流出することが判明した。以上の成果を踏まえ、秋田県内の食品企業を中心に素材展開及び秋田県、湯沢市の協力の得て食品クラスター構築を目指し、任意団体「こまち GABA 研究会」（現会員社数 45 社）を設立した。昨年度の研究会 GABA 商品販売実績が 3 億円（推定）に達した（第6図）。また、当社も本素材を配合した「発芽玄米酒



第6図 爛漫ギャバ素材配合の食品クラスター製品（パン、リキュール、ヨーグルト、菓子、発芽玄米、ドレッシング等）

GABA（リキュール）」を平成 16 年に製品化した。その後、本素材とぶどう果汁配合の「たっぷりぶどう GABA（リキュール）」を発売した。最近では、ノンアルコール飲料として、果汁飲料「ギャバパワー」を販売している（第7図）。

第2表 米糠発酵素材一般成分

Sample	水分 (g/100g)	タンパク質 (g/100g)	脂質 (g/100g)	炭水化物 (g/100g)	ナトリウム (mg/100g)	GABA (mg/100g)
米糠発酵液	88.0	2.2	0	8.1	220	1,000
米糠発酵粉末	4.1	20.1	32.0	30.6	450	1,500



第7図 美酒爛漫自社製品  
(左から 発芽玄米酒 GABA(リキュール)300ml/本, たっぶりぶどう GABA(リキュール)500ml/本, GABA パワー(果汁入り飲料)100ml/本)

## 7. おわりに

米どころ、酒どころとして有名な秋田県で大量発生する栄養源豊富な米糠及び醸造設備の有効利用を目的とし、米糠を唯一の発酵原料とした乳酸菌 *Lactobacillus brevis* IFO12005 による  $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)含有米糠発酵素材生産技術の開発及び製品化、本素材における SHR に対する降圧作用、メタボリック予防を目的したマウスに対する脂質代謝改善効果作用についての研究開発をした。米糠を唯一の栄養源とした米糠混合液(酵素未処理)にグルタミン酸ナトリウム(MSG)を1.5% (w/w) 加え、*L. brevis* IFO12005 の液体培養(30℃, 4日間)によるMSGからGABAへの変換率が79.7%, GABA生産0.8% (w/w)を確認した。同時に、品種の異なる米糠によるGABA生産に影響は生じなかった。また、米糠混合液を複合酵素処理することで、乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 の栄養源が倍増した。そこで、複合酵素処理した米糠培地の加水割合(米糠:水)を1:4から1:6に増加させ、1.2%

(w/w)のMSG添加による乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 の培養(30℃, 4日間)によるGABA生産の検討をした。結果、加水割合1:5以上の米糠培地では、培養2日目に83~86%の高いGABA変換率(83~86%)で、且つ乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 の増殖速度も加水割合1:4の米糠培地に比べ、最大乳酸菌数が1.5倍と高い増殖率であった。さらに、加水割合1:6の米糠培地に2.2% (w/w) MSGを加えた乳酸培養(30℃, 4日間)では、培養24時間でGABA変換率95%以上、1.1% (w/w) GABA生産を確認した。本乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 におけるMSG添加後の米糠培地の初発pHが4.7以下の場合、菌体増殖による菌体定常期に移行してもGABA生産抑制が推測された。以上から、本製法を用いた30 lジャー培養装置による米糠培地20kgスケールの培養により1.4% (w/w)のGABAを生産した。さらに、培養液を固液分離法を検討し、1.0% (w/w)以上のGABA含有組成物の液体、固体の製造、製品化に成功した。

本素材を高血圧自然発症ラット(SHR)に対してGABA濃度10mgを単回投与したところ、投与2時間後まで緩やかな降下傾向を示したが有意差は確認できなかった。さらに、試薬品GABA10mgを同等に単回投与した結果、有意な血圧降下作用を認めた。GABAを同濃度投与したにも関わらず、本素材は血圧降下傾向であったことから、不明ではあるが本素材中に血圧降下に対する阻害因子の存在が示唆された。さらに、高脂肪食(High Fat Diet 32)に凍結乾燥した本素材を1% (w/w)配合し、マウス(C57BL/6; 6週齢:♂)給与による脂質代謝改善効果作用を確認した。結果、無添加の高脂肪食と比べ体重、臓器重量における影響は及ばなかった。また、血液中脂質成分をゲル濾過HPLCで4種のリポタンパク質(CM, VLDL, LDL, HDL)に分離後、オンライン酵素法で定量した(LipoSEARCH (r))結果、米糠発酵素材添加区の給与マウスにおいて総中性脂肪値、VLDL-リポタ



ンパク質中コレステロール値, LDL 及び VLDL-リポタンパク質中中性脂肪値で有意差 ( $p < 0.01$ ) を確認した。しかし, 善玉リポタンパク質と呼ばれる HDL-リポタンパク質中コレステロール, 中性脂肪値に影響がないことから, 米糠発酵素材は中性脂肪等の改善効果が期待される。

以上から, 米糠の有効利用を目的とし, 醸造設備を活用した乳酸菌 *L.brevis* IFO12005 による GABA 含有新規機能性素材の開発, 実用化に成功した。今後も本素材の多目的用途の利用化, 新規機能性成分の探索による付加価値化を目指し, 秋田県から米糠機能性素材が配合した各食品が全国展開し, 少しでも秋田の活性化に繋がればと願う。

本研究は, 秋田県総合食品研究所との共同研究成果であり, 且つ平成 19, 20 年経済産業省地域資源活用型研究開発型事業からの助成による研究成果である。

#### 謝辞

本研究開発を遂行するにあたり, 秋田県総合食品研究所 畠主任研究員には「マウスの脂質代謝改善効果」, 東京農業大学古庄教授には「高血圧自然発症ラット動物試験」の実施ならびに貴重なご助言, ご指導をいただき感謝いたします。

最後に, 本研究を開始した平成 14 年から多大なるご指導を頂きました東京農業大学戸枝教授 (前職; 財団法人あきた企業活性化センター) には心より深謝いたします。

〈秋田銘醸株式会社 製造部研究室〉

#### 文献

- 1) 浜田尚樹, 村北宏之: 島津評論, 45, 183-187 (1988)
- 2) H. C. Stanton: Arch. Int. Pharmacod, 143, 195-204 (1963)
- 3) 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: 食工誌, 47, 596-603 (2000)
- 4) 堀江健二, 東口伸二, 横越英彦: FOOD-Style21, 8 (3), 64-68 (2004)
- 5) T. Saikusa, T. Horino and Y. Mori: J. Agric. Food Chem., 42, 1122-1125 (1994)
- 6) 戸枝一喜, 青木淳子, 熊谷亮, 伊藤汎: 秋田県総合食品研究所報告, 4, 25-29 (2002)
- 7) 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)
- 8) 岡田忠司: 食品と開発, 36, 7-9 (2001)
- 9) 杉下朋子: 食品と開発, 36, 10-11 (2001)
- 10) 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森正司, 岡本順子: 農化, 61, 817-822 (1987)
- 11) 渡辺敏郎, 今城小百合, 井上美保, T. K. Mazumder, 永井史郎, 辻 啓介, 段 武夫: ヘモレオロジー学会誌, 7, 39-43 (2004)
- 12) 愛宕世高, 戸田登志也, 奥平武則: 食品と開発, 36, 12-14 (2001)
- 13) 大友理宣, 木村貴一, 渡辺誠衛, 戸枝一喜: 生物工学, 84, 479-483 (2006)
- 14) Y. Ueno, K. Hayakawa, S. Takahashi, K. Oda: Biosci. Biotech. Biochem., 61, 1168-1171 (1997)
- 15) 早川 潔, 上野義栄, 河村真也, 谷口良三, 小田耕平: 生物工学, 75, 239-244 (1997)
- 16) 吉澤みな子, 井上正子, 奥田豊子, 中村尚夫: 大阪教育大学紀要, 48, 123-130 (2000)
- 17) M. Okazaki, S. Usui, M. Ishigami, N. Sakai, T. Nakamura, Y. Matsuzawa, S. Yamashita: Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 25, 578-584 (2005)