

乳酸発酵によってGABAを強化した黒糖の開発

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	広瀬,直人 前田,剛希 照屋,亮 高良,健作 和田,浩二
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	43巻6号
掲載ページ	p. 269-273
発行年月	2017年11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



乳酸発酵によってGABAを強化した黒糖の開発

広瀬直人^{*1§}・前田剛希^{*1}・照屋 亮^{*1}
高良健作^{*2}・和田浩二^{*2}

*1 沖縄県農業研究センター

*2 琉球大学農学部

Development of GABA-enriched Non-centrifugal Brown Sugar “Kokuto” by Lactic Acid Fermentation

HIROSE Naoto^{*1§}, MAEDA Goki^{*1}, TERUYA Ryo^{*1},
TAKARA Kensaku^{*2} and WADA Koji^{*2}

*1 Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, 820 Makabe, Itoman City, Okinawa 901-0336

*2 Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213

γ -Aminobutyric acid (GABA)-enriched non-centrifugal brown sugar, “Kokuto”, was developed by lactic acid fermentation method. *Lactobacillus brevis* NBRC 3345 was inoculated into sugar cane juice containing added sodium glutamate and yeast extract and cultured at 30°C. Addition of the yeast extract was necessary for GABA production by *L. brevis* NBRC 3345 from sugar cane juice. Sodium glutamate and yeast extract were added to the sugar cane juice to a concentration of 0.2% each. GABA-enriched Kokuto containing 275mg GABA per 100g Kokuto was made successfully from the juice fermented for 24h. Solid Kokuto could not be produced from juice fermented for 30h. However, it was possible to produce solid Kokuto containing 302mg GABA per 100g Kokuto, when fresh juice and fermented juice were mixed in a ratio of 1:4.

(Received Apr. 3, 2017; Accepted Jul. 19, 2017)

Key words : non-centrifugal brown sugar, *Lactobacillus brevis*, lactic acid fermentation, GABA
黒糖, *Lactobacillus brevis*, 乳酸発酵, GABA

沖縄県の特産品である黒糖は、サトウキビ (*Saccharum* spp. hybrid) の搾汁液をそのまま加熱濃縮して製造される含みつ糖である¹⁾。そのため黒糖には、ショ糖に加えて γ -アミノ酪酸 (GABA) をはじめとするアミノ酸やミネラル²⁾、ポリコサノール類³⁾などサトウキビ由来の有用成分を豊富に含んでいる。さらに、黒糖に含有されるフェノール性抗酸化成分⁴⁾やLDL (低比重リポタンパク) 酸化抑制作用⁵⁾、抗動脈硬化作用⁶⁾やフラボン配糖体のNO産生抑制作用⁷⁾などが明らかとなり、甘味資源に加えて健康機能性の面からも注目されている。

GABAは血圧上昇抑制効果⁸⁾や抗ストレス効果⁹⁾、睡眠の質改善効果¹⁰⁾、皮膚改善効果¹¹⁾など多様な機能が報告され、注目されている。微生物においては培地の酸性化に対する防御機構の一つとして、グルタミン酸よりグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) によって生成される¹²⁾。

乳酸菌にGABAを生産する菌株¹³⁾が見出され、乳酸発酵によりGABA含有量を高めた食品の開発¹⁴⁾が報告されるなど、食品分野でもGABAの機能性に着目した研究が展開されている。そこで本研究では、付加価値を高めた黒糖の製造技術開発を目的として、乳酸発酵を利用してGABAを増強した黒糖の開発を試みた。

実験方法

1. 供試材料

サトウキビは沖縄県農業研究センター圃場で栽培したNiF8 (夏植え, 2008年1月収穫) を用いた。収穫した未出穂茎を脱葉し、完全展開葉第5葉より上部を切除した原料茎をサトウキビ小型圧搾機 (TM340, マツオ) で搾汁し (搾汁率50%), Brix25.5, pH5.2の搾汁液を得た。サトウキビ搾汁液は80°Cまで加熱した後に遠心分

*1 〒901-0336 沖縄県糸満市真壁820番地

§ Corresponding author, E-mail: hirosent@pref.okinawa.lg.jp

*2 〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1番地

離(9,000×g, 10分間)で不溶性成分を除去し, 105℃で15分間加熱殺菌して, サトウキビ搾汁液培地(CJ培地, pH5.3)として用いた。グルタミン酸ナトリウム(和光純薬)および酵母エキス(ナカライ)は0.20μmのメンブレン(Minisart RC15, Sartorius)でろ過除菌し, 加熱殺菌した培地に添加した。

2. 供試乳酸菌株

乳酸菌はサトウキビ搾汁液が植物性の素材であることから, 植物性乳酸菌¹⁵⁾である*Lactobacillus brevis*を6株(いずれも生物遺伝資源センター株)供試した(Table 1)。MRS培地(関東化学, pH6.2±0.2)を用いて30℃で24時間培養した培養液をCJ培地に接種し, 30℃で24時間の静置培養した培養液をさらにCJ培地に植え継いで培養したものをスターターに用いた。

3. CJ培地でGABAを生産する乳酸菌株の選択

0.1%のグルタミン酸ナトリウム(MSG)と酵母エキス(YE)を添加したCJ培地(pH5.3)に乳酸菌スターターを1%接種し, 30℃で48時間静置培養を行った。培養液より遠心分離(2,000×g, 2分間)で乳酸菌体を除去した上清の遊離アミノ酸組成を分析し, GABAの生産量を指標に乳酸菌株を選択した。アミノ酸の分析にはアミノ酸分析システム(LC-VPアミノ酸分析システム, 島津製作所)を使用した。カラムはShim-pack Amino-Na(島津GLC)を用い, *o*-フタルアルデヒドを反応試薬として蛍光強度(Ex=348nm, Em=450nm)を蛍光検出器(RF-10AXL, 島津製作所)で測定した。生菌数の測定には, BCP加プレートカウント培地(Merck, pH6.9)を用いた。滅菌生理食塩水で培養液を適宜希釈して混釈平板を作成し, 37℃で72時間培養して出現したコロニーを計数した。

4. 乳酸発酵条件の検討

発酵温度の検討では, 0.1%のMSGとYEを添加したCJ培地に乳酸菌スターターを1%接種して25~40℃で96時間静置培養を行い, 24時間毎に培地のGABA含有量と660nmの吸光度を測定した。MSG添加濃度の検討ではMSGを0.05~1.0%, YEを0.5%添加したCJ培地(pH5.4~5.6)を用い, 96時間静置培養を行った。また, YE添加濃度の検討ではYEを0.05~1.0%, MSGを0.5%添加したCJ培地(pH5.3~5.5)を用いて, 同様に培養試験を行った。

5. 黒糖の試作方法

0.2%のMSGとYEを添加して乳酸菌スターターを1%接種し, 30℃で乳酸発酵させたCJ培地に水酸化カルシウムを添加してpH7.5に調整し, 80℃まで加熱した後に遠心分離(9,000×g, 10分間)で不溶性成分を除去して清澄化するコールドライミング¹⁶⁾を行った。清澄化した搾汁液を常圧下で加熱濃縮し, シラップ温度が130℃に達した時点で加熱を終了した。得られた過飽和シラップをステンレス製ボウルに移して攪拌しながら冷却し, 固化させて黒糖を試作した¹⁷⁾。

6. 成分分析方法

色調の測定には黒糖の20%水溶液を用い, 分光測色計(CM-2600d, コニカミノルタ)で透過反射光を測定して, L*a*b*表色系で表示した。着色度の測定には黒糖の4%水溶液を用い, 0.2NのNaOHでpH7.0に調整した後に420nmの吸光度を測定し(μQuant, Bio-Tek), ICUMSA色価を算出した¹⁸⁾。有機酸の分析には有機酸分析システム(LC-10A, 島津製作所)を用いた。カラムはShim-pack SPR-H(7.8×250mm, 島津GLC)を2本直列接続し, 移動相は5mM *p*-トルエンスルホン酸, 緩衝液には5mM *p*-トルエンスルホン酸と100μM EDTAを含む20mM Bis-Trisを用いた。流速を0.7ml/minとし, カラム温度は1本目を25℃, 2本目を45℃とした。検出器には電気伝導度検出器(CDD-6A, 島津製作所)を用いた。糖組成は液体クロマトグラフ(LC-20A, 島津製作所)で分析した。カラムはAsahipak-NH₂P-50(4.6×250mm, Shodex)を用い, 移動相は75%アセトニトリル, 流速を1.0ml/minとし, カラム温度は40℃とした。検出器には蒸発光散乱検出器(ELSD-LT, 島津製作所)を用いた。

実験結果と考察

1. CJ培地でGABAを高生産する乳酸菌株の選択

CJ培地に*L. brevis*の6株を接種して30℃で48時間培養したところ, いずれの菌株もCJ培地に生育したものの, GABAの蓄積はみられなかった(Table 1)。また, 乳酸菌によるGABA生産の前駆体であるグルタミン酸(MSG)を添加しても, 同様にGABAの蓄積は見られなかった。乳酸菌によるGABA生産にはYEを添加した培地がよく用いられる¹⁴⁾。そこでCJ培地にMSGに加えてYEを添加したところ, *L. brevis* NBRC 3345が顕著にGABAを生産したことから, 本菌株をサトウキビ搾汁液におけるGABA生産菌として以下の実験に用いた。麴菌由来のGADでは活性の発現に補酵素であるピリドキサルリン酸が必要であること¹⁹⁾や, 乳酸菌由来のGADは硫酸イオン濃度の増加によって活性が増大すること²⁰⁾が報告されている。YEの添加による*L. brevis* NBRC 3345の生菌数増加は1.4倍程度であることから, 顕著なGABA生産量の増加はGADの補酵素あるいは活性を増大させる物質がYEに含有されている可能性を示唆しており, 今後詳細な検討が必要と考えている。

2. 乳酸発酵条件の検討

GABA生産量を指標に, *L. brevis* NBRC 3345による乳酸発酵条件を検討した。CJ培地にMSGとYEを各0.1%添加して25~40℃で培養したところ, 培養温度30℃以上では24時間, 25℃では48時間で定常期に達した。GABA生産量は培養温度25~30℃では培養48時間で56mg/100ml程度に達した。一方, 培養温度35℃でのGABA生産量は培養48時間で24mg/100mlと低くなり, 培養温度40℃ではほとんど生産されなかった(Fig. 1)。サトウキビ搾汁液を含有した乳培地で*L. lactis*を培養した場合は30~

Table 1 Comparison of GABA production by *Lactobacillus brevis* in different media

Strain	CJ			CJ+MSG			CJ+MSG+YE		
	Growth	Glu	GABA	Growth	Glu	GABA	Growth	Glu	GABA
NBRC 3345	2.7	1.2	6.5	3.0	71.2	6.5	3.7	13.1	52.8
NBRC 3960	1.9	1.4	6.3	1.8	73.6	6.5	3.1	74.0	9.7
NBRC 12005	2.1	1.1	6.1	2.5	59.4	8.1	2.4	77.1	7.3
NBRC 12520	3.3	0.9	6.2	2.4	69.4	8.5	3.5	67.7	13.5
NBRC 13109	3.6	0.9	6.2	3.8	68.9	6.1	4.1	75.8	6.8
NBRC 13110	1.9	1.0	6.0	2.2	74.6	6.1	2.2	74.9	6.8
Control	—	0.6	5.9	—	77.8	6.7	—	79.5	6.8

0.1% of MSG (and YE) were added to CJ medium and incubated at 30°C for 48hr.
Growth ($\times 10^8$ cfu/100ml), Glu: Glutamic acid, GABA: γ -aminobutyric acid (mg/100ml)

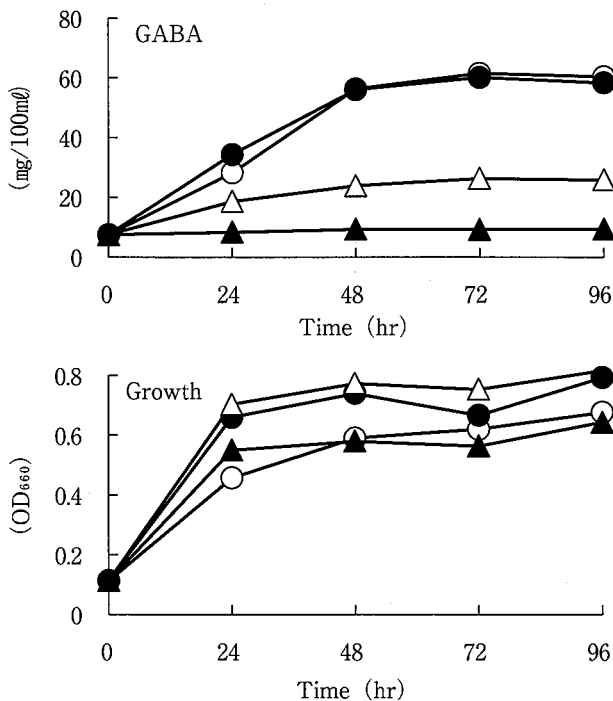


Fig. 1 Effect of culture temperature on GABA production by *Lactobacillus brevis* NBRC 3345

Sugar cane juice containing 0.1% MSG and YE was used as the culture medium.

Growth was indicated by absorbance at 660nm.

(○ : 25 °C, ● : 30 °C, △ : 35 °C, ▲ : 40 °C)

35°CでGABAを良好に生産しており²¹⁾, GABA生産における最適温度は乳酸菌株や培地条件によって異なるものと考えられた。これらの結果より, 培養温度は25°Cまたは30°Cが適すると判断し, 平均気温の高い沖縄でも冷却の必要が少ない30°Cで以下の実験を行った。

CJ培地へのMSG添加濃度を0.05~1.0%としたところ, MSGの増加に伴って菌体の生育も僅かに増加したが, いずれの濃度でも培養48時間で菌体の増殖が定常期に達し, GABAが急激に増加した (Fig. 2)。GABAの生産量はMSG添加濃度が高くなると多くなったが, GABAの

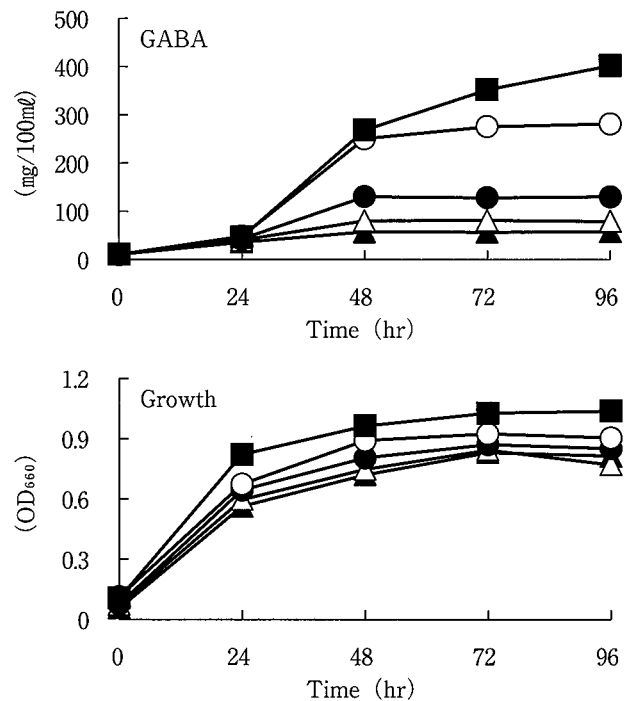


Fig. 2 Effect of MSG concentration on GABA production by *Lactobacillus brevis* NBRC 3345

Sugar cane juice containing 0.5% YE was used as the culture medium.

The cultures were incubated at 30 °C.

Growth was indicated by absorbance at 660nm.

MSG content (▲ : 0.05%, △ : 0.1%, ● : 0.2%, ○ : 0.5%, ■ : 1.0%)

生産効率 (グルタミン酸 1 molの添加に対して得られるGABAのモル濃度) では, MSG添加濃度0.2%以下では培養48時間ではほぼ100%近くになったが, 0.5%添加では84%, 1.0%添加では49%と低くなった。培養96時間でのGABA生産効率は, 0.5%添加で95%, 1.0%では73%まで上昇したが, 長時間の培養を要することから効率的ではないと考えられた。

次にYE添加濃度について検討した。添加濃度を0.05~1.0%としたところ, YEの増加に伴って菌体の生育も増加し, 添加濃度0.2%以上では培養48時間でGABA生

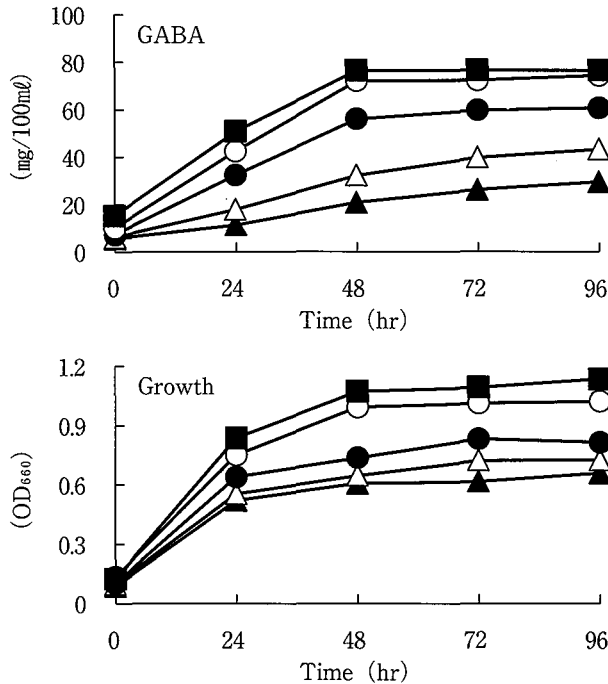


Fig. 3 Effect of YE concentration on GABA production by *Lactobacillus brevis* NBRC 3345

Sugar cane juice containing 0.1% of MSG was used as the culture medium.

Cultures were incubated at 30 °C.

Growth was indicated by absorbance at 660nm.

YE content (▲ : 0.05%, △ : 0.1%, ● : 0.2%, ○ : 0.5%,

■ : 1.0%)

産量がほぼ平衡に達した。一方、添加濃度0.05~0.1%では培養48時間目以降もGABA生産量が緩やかに増加した (Fig. 3)。培養48時間目でYE添加量当たりのGABA生産量を比較すると、添加濃度0.2%が最も高くなった。

これらの結果より、蔗汁に添加するMSGおよびYE濃度は、いずれも0.2%とした。

3. GABA高含有黒糖の試作

L. brevis NBRC 3345を接種して30°Cで48時間培養したCJ培地を用いて黒糖製造を試みたが、全く固まらなかった。サトウキビ搾汁液には乳酸菌等の微生物がよく生育し、デキストラン等の代謝生成物がショ糖の結晶化を阻害することが指摘されている²²⁾。そこで、培養時間を24~30時間と短縮し、黒糖を試作した。その結果をTable 2に示す。培養24時間の搾汁液を用いると、GABA含有量は274.7mg/100gDWに止まるものの、固形黒糖を製造できた。しかし、培養30時間の搾汁液を用いると、GABA含有量は419.3mg/100gDWに達したが、完全には固化しなかった。そこで、培養30時間の搾汁液に新鮮なCJ培地を1/4量添加して製糖したところ、GABA含有量が301.6mg/100gDWで、やや軟らかい黒糖が製造できた。得られたGABA高含有黒糖は、いずれも市販の黒糖よりも黄色が強く (b*値が高い)、色相値 (a*/b*) が小さい傾向にあり、着色度も高めであった。

以上の結果より、乳酸発酵を利用することで、GABAを増強した黒糖を製造できることが明らかとなった。サトウキビ搾汁液には微生物が容易に繁殖する²²⁾ことを利用して、GABA以外にも微生物に生産させた有用物質を含有した黒糖を製造することで、黒糖の高付加価値化が可能であると思われた。一方、GABA高含有黒糖は乳酸を多く含むため、食味に及ぼす影響の評価が必要である。今後は、乳酸発酵によって黒糖が固化しにくくなった要因を解明し、GABAをより強化した黒糖の製造を試みると共に、ヒトに対する機能性の評価を進めていきたいと考えている。

Table 2 Characteristics of GABA-enriched *Kokuto*

	GABA-enriched <i>Kokuto</i> (mean ± SE, n = 8)			<i>Kokuto</i> ^x
	24	30	30	
Culture time (hr)	24	30	30	—
Fresh juice added after fermentation ^y	not added	not added	added	—
GABA (mg/100gDW)	274.7 ± 5.4	419.3 ± 11.4	301.6 ± 8.1	15.7 ± 1.0
Glutamic acid (mg/100gDW)	277.0 ± 8.8	79.0 ± 9.3	71.3 ± 4.2	29.7 ± 2.3
Sucrose (g/100gDW)	93.0 ± 0.5	91.3 ± 0.7	91.0 ± 0.3	84.4 ± 2.5
Reducing sugar (g/100gDW)	0.18 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.70 ± 0.06
Lactic acid (mg/100gDW)	955.2 ± 13.6	1244.8 ± 45.5	870.9 ± 30.6	264.9 ± 50.3
Color L*	35.7 ± 1.0	32.4 ± 0.4	37.2 ± 0.7	27.3 ± 0.6
a*	8.2 ± 0.7	8.7 ± 0.1	6.3 ± 0.5	4.2 ± 0.7
b*	17.0 ± 1.5	12.4 ± 0.6	17.3 ± 0.6	3.6 ± 1.0
a*/b*	0.49 ± 0.02	0.71 ± 0.04	0.38 ± 0.05	1.47 ± 0.18
Color value (ICUSMA 10 ^{^3})	14.4 ± 0.2	18.4 ± 0.9	16.0 ± 0.8	12.7 ± 0.9
Hardness	++	not solidify	+	++

^xRepresentative means of commercial *Kokuto*²³⁾

^yFresh juice and fermented juice were mixed in a ratio of 1:4.

要 約

乳酸発酵を利用して γ -アミノ酪酸 (GABA) を強化した黒糖を開発した。サトウキビ搾汁液にグルタミン酸ナトリウムと酵母エキスを添加し, *Lactobacillus brevis* NBRC 3345を接種して30℃で乳酸発酵させた。*L. brevis* NBRC 3345によるGABA生産には, サトウキビ搾汁液に酵母エキスの添加が必要であった。グルタミン酸ナトリウムと酵母エキスの最適添加濃度は, いずれも0.2%であった。24時間乳酸発酵させた搾汁液で製糖すると, GABAを275mg/100g含有する黒糖を製造することができた。30時間乳酸発酵させた搾汁液では, そのままでは固形の黒糖を製造できなかったが, 1/4量の新鮮な搾汁液を添加することで302mg/100gのGABAを含有する固形の黒糖を製造できた。

文 献

- 1) 中田栄太郎・前田直彦・谷口 修・酒井一幸: 黒糖製造法, シュガーハンドブック (朝倉書店, 東京), pp.106~118 (1964)
- 2) 広瀬直人・前田剛希・高良健作・和田浩二: 沖縄産黒糖の常温保存における物理化学的およびフレーバー特性の変化, 日食保蔵誌, **41** (6), 253~259 (2015)
- 3) ASIKIN, Y., TAKAHASHI, M., HIROSE, N., HOU, D.X., TAKARA, K. and WADA, K.: Wax, policosanol, and long-chain aldehydes of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **114**, 583~591 (2012)
- 4) 和田浩二: 沖縄県特産物の機能性成分と加工利用に関する食品化学的研究, 日食保蔵誌, **37** (1), 17~27 (2011)
- 5) 前田剛希・萩 貴之: 沖縄産純黒糖の抗酸化能と糖類分解酵素阻害活性, 沖縄工技報, **10**, 1~5 (2008)
- 6) OKABE, T., TODA, T., INAFUKU, M., WADA, K., IWASAKI, H. and OKU, H.: Antiatherosclerotic function of Kokuto, Okinawan noncentrifugal cane sugar, *J. Agric. Food Chem.*, **57**(1), 69~75 (2009)
- 7) 萩 貴之・前田剛希: 沖縄産黒糖に含まれるフラボン配糖体, 沖縄工技報, **10**, 7~11 (2008)
- 8) INOUE, K., SHIRAI, T., OCHIALI, H., KASAO, M., HAYAKAWA, K., KIMURA, M. and SANSAWA, H.: Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **57**(3), 490~495 (2003)
- 9) YOTO, A., MURAO, S., MOTOKI, M., YOKOYAMA, Y., HORIE, N., TAKESHIMA, K., MASUDA, K., KIM, M. and YOKOGOSHI, H.: Oral intake of γ -aminobutyric acid affects mood and activities of central nervous system during stressed condition induced by mental tasks, *Amino Acids*, **43**(3), 1331~1337 (2012)
- 10) YAMATSU, A., YAMASHITA, Y., MARU, I., YANG, J., TATSUZAKI, J. and KIM, M.: The improvement of sleep by oral intake of GABA and *Apocynum venetum* leaf extract, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **61** (2), 182~187 (2015)
- 11) 外蘭英樹・上原絵里子: γ -アミノ酪酸の経口摂取による皮膚状態改善効果, 日食科工誌, **63** (7), 306~311 (2016)
- 12) HIGUCHI, T., HAYASHI, H. and ABE, K.: Exchange of glutamate and γ -aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain, *J. Bacteriol.*, **179**, 3362~3364 (1997)
- 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, 生物工学誌, **75** (4), 239~244 (1997)
- 14) 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その応用, 生物工学誌, **85** (3), 109~114 (2007)
- 15) 岡田早苗: 植物性乳酸菌世界とその秘める可能性, 日乳酸菌会誌, **13** (1); 23~36 (2002)
- 16) 山根嶽雄: 甘蔗汁清浄法, シュガーハンドブック (朝倉書店, 東京), pp.24~32 (1964)
- 17) 広瀬直人・前田剛希・照屋 亮・宮平守邦・比屋根真一・和田浩二: 再現性の高い試験用黒糖の製造方法の開発, 沖縄農研報, **8**, 40~44 (2014)
- 18) CHOU, C.C.: Determination of color and turbidity in sugar products, Cane sugar handbook (Wiley, N.Y.), pp.882~903 (1993)
- 19) 土谷紀美・西村賢了: 醸造用糸状菌のグルタミン酸脱炭酸酵素活性とその特性, 醸協, **97**, 382~386 (2002)
- 20) UENO, Y., HAYAKAWA, K., TAKAHASHI, S. and ODA, K.: Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1168~1171 (1997)
- 21) 広瀬直人・氏原邦博・照屋 亮・前田剛希・吉武均・和田浩二・吉元 誠: γ -アミノ酪酸 (GABA) を増強したサトウキビ乳酸発酵飲料の開発, 日食科工誌, **55**, 209~214 (2008)
- 22) EGGLESTON, G.: Deterioration of cane juice-sources and indicators, *Food Chem.*, **78**, 95~103 (2002)

(平成29年4月3日受付, 平成29年7月19日受理)