

## 乳酸菌による茶葉中での - アミノ酪酸の生産

誌名	茶業研究報告
ISSN	03666190
著者名	渡辺,祐子 早川,潔 植野,洋志
発行元	[出版者不明]
巻/号	107号
掲載ページ	p. 61-69
発行年月	2009年6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



## 乳酸菌による茶葉中での $\gamma$ -アミノ酪酸の生産

<sup>1)</sup> 福寿園(株)C.H.A研究開発センター

<sup>2)</sup> 奈良女子大学大学院人間文化研究科 共生自然科学専攻 応用微生物学研究室

渡辺 祐子<sup>1) 2)</sup>・早川 潔<sup>1)</sup>・植野 洋志<sup>2)</sup>

(平成20年9月3日受理)

## Production of $\gamma$ -Amino Butyric Acid in Tea Leaves with Treatment of Lactic Acid Bacteria

Yuko Watanabe, Kiyoshi Hayakawa and Hiroshi Ueno  
Fukujuyen Co., C.H.A Laboratory  
Nara Women's University

### Summary

Lactic acid bacteria was searched for producing fermented tea that contained a lot of  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA). Also examined were the growth condition, GABA production and changes in catechin contents in the tea leaves.

*Lactobacillus brevis* L12 was found to be suitable for the production of fermented tea since it gave as much GABA as gabaron tea when tea leaves being suspended with water at 10% and incubated for 4 days at 25°C. The amount of GABA produced was more than calculated based upon the content of glutamic acid in tea leaves. It is probable to assume that glutamate derived from glutamine and theanine is converted into GABA.

Keywords : Post-fermented tea, 後発酵茶  
 $\gamma$ -amino butyric acid  $\gamma$ -アミノ酪酸  
Glutamic acid グルタミン酸  
Lactic acid bacteria 乳酸菌

### 緒 言

緑茶は日本で、広く飲まれている嗜好品である。最近、食品工業原料としての市場が広がり、嗜好性や機能性を訴求した茶やその生

産方法の検討がより必要とされている。その中で、緑茶の製造方法を工夫することにより、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を豊富に含むギャバロン茶の製造方法が確立された<sup>1) 2) 3)</sup>。GABAは抑制性の神経伝達物質として知られ

<sup>1)</sup> 〒619-0223 京都府木津川市相楽台3丁目1-3

<sup>2)</sup> 〒630-8506 奈良県奈良市北魚屋西町

ており、血管拡張、交感神経抑制等による血圧上昇抑制作用や抗ストレス作用が注目されている。ギャバロン茶は、摘採直後の茶葉の生葉を嫌気性条件で保管することにより、生葉に含まれるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) が茶生葉中のグルタミン酸をGABAに変換することによって作られる<sup>4)</sup>。ギャバロン茶の生産には生葉中に含まれるGADが必要であることから、摘採直後加工することが不可欠であり、生産は季節的要因に束縛される。また、使用する生葉によりGABA生成量が異なる<sup>5) 6)</sup>ことも知られている。

一方、GABA生産性の高い乳酸菌<sup>7) 8)</sup>によりグルタミン酸からGABAを合成する技術があり、茶を微生物発酵することによりGABAを生産することも考えられる。微生物により発酵した茶として古くから知られている後発酵茶には種々の麹菌、酵母、乳酸菌が生育している。麹菌 (*Aspergillus oryzae*)<sup>9)</sup> やパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>10)</sup> はGAD遺伝子を持っているが、茶葉中で培養しても顕著なGABAの増加はない。また、後発酵茶の中で碁石茶は発酵中にGAD遺伝子を持つ乳酸菌 *Lactobacillus plantrum* が生育しており、碁石茶の香味に影響を与えていると推定されている<sup>11)</sup> が、GABAはほとんど含まれていない。*L. plantrum* は乳酸菌 *L. brevis* 等に比べてGABA生産能が小さい<sup>8)</sup> ためとも考えられるが、GABA生産性の高い乳酸菌 *L. brevis* においても茶葉中ではGABAの生産が阻害されており、カテキンを含む茶タンニンが原因と推測されている<sup>12)</sup>。このようにGABAを豊富に含んだ後発酵茶はいまだ開発されていない。

そこで今回、乳酸菌による茶葉中でのGABAの生産を目的に、茶葉成分から効率的にGABAを生産する乳酸菌を探索するとともに、菌種、水分含量 (カテキン濃度) 及びエネルギー源の有無がGABA生産に与える影響について検討した。

## 実験方法

乳酸菌の分離：市販のキムチまたは市販のキムチに1%になるようにグルタミン酸を加え、25℃、7日間培養した培養物から採取した液汁を、日本製薬製のBCP加プレートカウントアガール培地 (以下、BCP培地という) に混積培養し、25℃、7日間培養後のコロニーを分離した。分離した菌を1%グルタミン酸1ナトリウム (以下MSGと記載) 添加GYP培地 (グルコース 1%, 酵母エキス 1%, ポリペプトン 0.5%, 酢酸ナトリウム三水和物 0.2ppm, 硫酸マグネシウム四水和物 0.1ppm, 硫酸第一鉄七水和物 0.1ppm, 食塩 0.1ppm) で25℃、7日間培養した後のGABA含量を測定した。

乳酸菌の同定：16S ribosomal RNA 遺伝子 (16S rDNA) の塩基配列は、PCRにより5'末端側500bpの領域を増幅し、サイクルシーケンス法で決定した。得られた16S rDNA塩基配列を用いてBLASTを用いてGenBank/DDB/EMBLに対する相同性検索を行った。

GAD活性の測定：培養液10mlを遠心分離 (3000rpm, 10分間) し、得られた沈殿を10mM PBS緩衝液で2回洗浄して乳酸菌菌体を得た。その菌体に1mMフェニルメチルスルホンフルオライド (PMSF) 入りの10mM PBS緩衝液1mLを加え、氷温下、超音波 (15秒粉碎 1分間放冷) で30分粉碎した後、遠心分離 (12000rpm 5分間) して得られた上清を酵素液とした。酵素液 10μLに、0.1M グルタミン酸・1mM ピリドキサル5'リン酸 (PLP) 10μL, 1Mピリジン塩酸緩衝液 (pH4.5) 10μLと水70μLを加え、37℃ 30分間反応させた。反応後、60%過塩素酸 4μLを加え3000rpmで5分間遠心分離して得られた上清を酵素反応測定液とし、GABA含量を測定した。別途、酵素液の蛋白量をBradford法にて定量し、比活性を求めた。使用菌種：乳酸菌は *L. brevis* 類縁菌L12 (市

販キムチより分離), *L. brevis* IFO12005及び *L. hilgardii* K3 (京都府中小企業総合センターより分譲) を使用した。

使用茶葉: 一番茶(京都産)の茎茶をミキサーで粉砕して使用した。

茶葉の発酵プロセス: 茶葉に所定量の水を加えたもの(特に断りのない場合10%茶葉懸濁液を用いる)を基本組成とし, 必要に応じて, グルコース10%, MSG1%を加え, 塩酸でpH6.0または3.5に調整し, これを発酵用茶葉培地とした。培地はビーカーに入れアルミホイルで蓋をし, 121℃, 20分間滅菌した後, 25℃, 2日間GYP培地で前培養した乳酸菌を接種した。所定時間25℃で静置培養した茶葉培地は, 90℃で乾燥し, 乾燥茶葉試料とした。乳酸菌の計測: 10%以下の茶懸濁液については沈殿をよく混和し, 先を切った200 $\mu$ Lのチップで100 $\mu$ Lを計量し, 茶葉含量が多く半固体状態である15~50%の含水茶葉については滅菌したスパーテルで含水茶葉 約0.1gを計量し, 滅菌水で混釈し, BCP培地で25℃, 48時間培養後のコロニーを計測した。

分析試料の調整: 酵素反応測定液はそのまま分析した。培養液は1mLに同量のアセトニトリルを加えて3000rpmで10分間遠心分離して得られた上清を分析に供した。乾燥茶葉試料は1gを粉砕し, 100mLの熱湯で30分間抽出した液を3000rpmで10分間遠心分離し, 得られた上清を分析に供した。

GABA, 遊離アミノ酸類及びテアニンの分析<sup>13)</sup>: オルトフタルアルデヒド(OPA)でプレラベル化しHPLC法(島津製作所製LC-6A)で分析した。分析条件は, 移動層0.1Mクエン酸緩衝液(pH3.0)・アセトニトリル混液, カラムTSK-gel ODS-80TM(4.6mm $\times$ 150mm), 励起波長350nm, 検出波長450nmを用いた。カテキン類及びカフェインの分析<sup>13)</sup>: HPLC法で分析した。分析条件は, 移動層0.1Mリン酸緩衝液(pH3.0)・アセトニトリル混液, カラムTSK-gel ODS-80TM(4.6mm $\times$ 150mm),

検出波長280nmを用いた。

## 実験結果

### 1. 市販キムチからの乳酸菌の分離

市販キムチ18種類から, 直接, 乳酸菌選択培地を用いてGABA生産性の高い菌の分離を試みたが, GABAを多く産生する菌は認められなかった。そこで, キムチにMSG1%を加えて25℃, 7日間追加熟成し, GABA産生菌の増加を試みた。その結果, GABAを多く産生する菌として, 3種類の菌が分離でき, L12, L14, L15と名づけた。これらの乳酸菌を7日間培養した後, GAD活性を測定したところ, それぞれのタンパク質あたりの活性は, L12は0.8U/g, L14は0.6U/g, L15は0.2U/gであった。その中でGAD活性の最も高いL12を選択し, 菌の形態観察と16S rDNA分析を行った。L12はグラム陽性の桿菌で16S rDNA分析の結果, *L. brevis* (ATCC 14869)と99.8%の相同性を示したことから, *L. brevis*の類縁菌と推定し, *L. brevis* L12と命名した。

### 2. 茶葉中でのGABA生産

今回分離した*L. brevis* L12のGABA生産量をGYP培地で検討した。静置培養4日の結果をグルコース無添加と10%グルコース添加の2条件で比較したところ, 10mg/mLのグルタミン酸からグルコース無添加で1.2mg/mL, 10%グルコース添加で1.5mg/mLとほとんど同じ量のGABAを生産した。そこで, *L. brevis* L12とGABA生産性の高い乳酸菌として知られる*L. brevis* IFO12005, *L. hilgardii* K3の3種の乳酸菌の茶葉懸濁液中での生育とGABA生産について, グルコース添加の影響も含めて検討した。

図1に示すように, 3種の乳酸菌共に生育はグルコース添加の有無にかかわらず順調であったが, GABAはグルコース無添加のみに増加した。GABA増加量は*L. brevis* L12が最大であった。

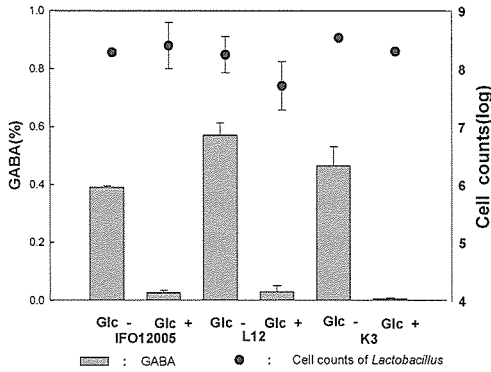


図1. GABAの増加と乳酸菌の生育（グルコースの有無による違い）

Increase of GABA and final cell counts, lactic acid bacteria was cultivated at 25°C for 4days in 10% tea leaves suspended water with 10% glucose or none.

3. 茶葉培地の水分含量及びグルコースの有無とGABA生産

茶葉中での培養において水分含有量とカテキン濃度による生育阻害やGAD酵素活性低下等の影響を調べるため、茶の水分含有量を変化させた茶葉中での*L. brevis* L12の生育とGABAの蓄積について検討した。含水茶葉粉

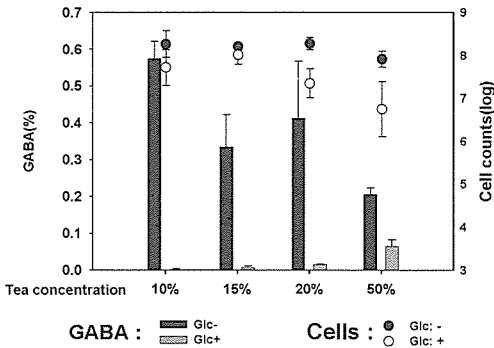


図2. GABAの増加と乳酸菌 *L. brevis* L12の生育（培地中の茶濃度とグルコースの有無による違い）

Increase of GABA and final cell counts, *L. brevis* L12 was cultivated at 25°C for 4days in tea-suspended water (10,15,20,50%) with 10% glucose or none.

末は茶葉含量15%以上で粘土状の半固体となった。図2に4日間培養した結果を示す。

グルコースを10%添加した場合は、水分量が多い程乳酸菌は増殖した。しかし、GABAの蓄積は水分量の少ない場合にわずかに見られたが、水分量が多く生育のよい場合にはほとんど見られなかった。次に、グルコース無添加の場合でも水分量にかかわらず、乳酸菌は順調に増殖し、茶葉含量10~50%までGABAの蓄積が認められた。ただし、水分の減少とともにGABA生産量は減少する傾向があり、茶葉含量50%では10%茶葉懸濁液の約1/3（茶葉乾物中）となった。

4. 茶葉中のpH及びグルコースの有無とGABA生産

10%茶懸濁液の初発pHを塩酸でpH3.5および6に調整し、10%グルコース添加の有無との関連について、*L. brevis* L12の生育とGABAの蓄積を検討した。4日間培養した結果を図3に示す。

中性（pH6）条件下ではグルコースの添加の有無にかかわらず、乳酸菌はよく生育した。

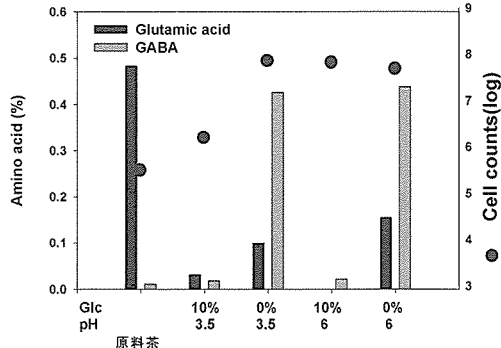


図3. 茶葉中のGABAとグルタミン酸含量と乳酸菌 *L. brevis* L12の生育（培地中のグルコースの有無とpHによる違い）

Concentration of glutamic acid and GABA and final cell numbers, *L. brevis* L12 was cultivated at 25°C for 4days in tea leaves suspended water (pH 3.5, pH6) with 10% glucose or none.

pHはほとんど変化しなかった。グルコース無添加では茶葉中のグルタミン酸減少、GABA量の蓄積が見られた。しかし、10%グルコースを添加すると、グルタミン酸は消失し、GABAの蓄積も観察されなかった。

酸性 (pH3.5) 条件下では、グルコース無添加ではよく生育したが、10%グルコースを添加した場合には生育を阻害する傾向にあった。この場合もpHはほとんど変化しなかった。グルコース無添加では、茶葉中のグルタミン酸含有量の減少、GABAの蓄積は中性条件と同じであった。グルコースを添加した場合でも、グルタミン酸の消失、GABAがほとんど蓄積しなかったことも中性条件と変わりなかった。

このときの茶葉のグルタミン酸、その誘導体であるグルタミンやテアニン及び生成産物であるGABAの含量変化 (nmol/mg) を図4に示す。どのpH領域においても、グルコースを添加した試験区では、グルタミン酸やそのアミド誘導体であるテアニンやグルタミンの消失がみられ、GABAの蓄積も観察されな

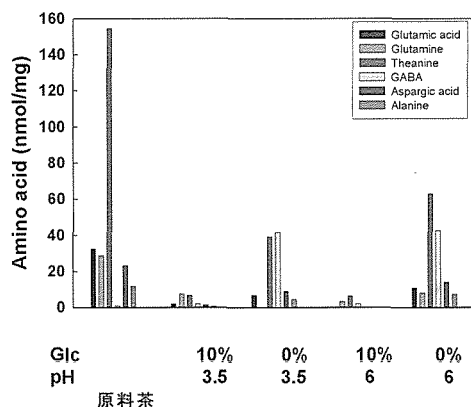


図4. 茶葉中のアミノ酸含有量の変化 (培地中のグルコースの有無とpHによる違い)

Concentration change of amino acid in tea leaves, *L. brevis* L12 was cultivated at 25°C for 4days in tea leaves suspended with water at 10% (pH 3.5, pH6) with 10% glucose or no glucose.

かった。これに対して、グルコースを添加しなかった試験区では、グルタミン酸、テアニンやグルタミン量は残存するものの減少した。GABAの蓄積は観察されたが、その生成量はグルタミン酸の減少量より多いという結果であった。

#### 5. 生育条件による茶カテキン類の変化

乳酸菌繁殖による茶の成分であるカテキンとカフェインの変化を調べた。カテキンは121°Cで加熱殺菌した際に立体異性化することを考え、総カテキンとして算出した。

その結果、どの条件でもカテキン類は著しく減少した。乳酸菌の生育が大幅に抑制された酸性・糖質添加条件を除くと中性・糖質無添加条件下で減少が最も少なかった。また、カフェインは酸性条件下でわずかに減少したが、中性ではほとんど分解しないことが判明した。

#### 6. GABAの豊富な後発酵茶の生産

GABAの蓄積とカテキン、カフェインの分解を考慮すると、中性・糖質無添加の茶懸濁

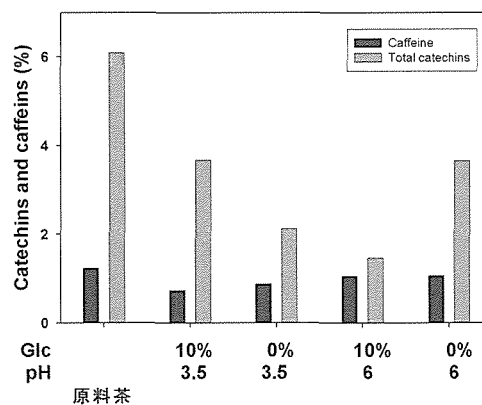


図5. 茶葉中のタンニン含有量の変化 (培地中のグルコースの有無とpHによる違い)

Concentration change of catechins and caffeine in tea leaves, *L. brevis* L12 was cultivated at 25°C for 4days in tea leaves suspended with water at 10% (pH 3.5, pH6) with 10% glucose or none.

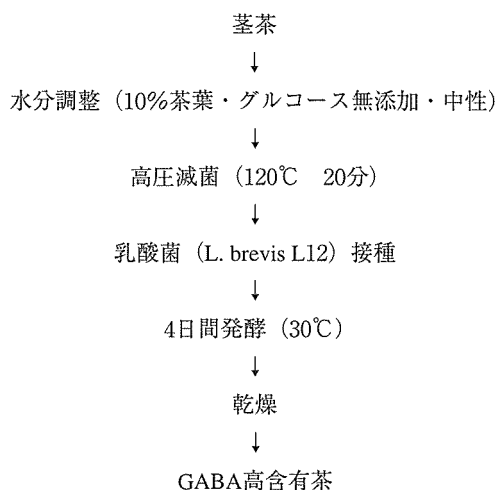


図6 GABAの豊富な後発酵茶の製造工程.

液中で乳酸菌を培養することがGABAの豊富な後発酵茶の生産に最も適していると考えられる。そこで、10%茶懸濁液（中性・糖質無添加）中で*L. brevis* L12を4日培養した後、乾燥することにした。工程は図6に示す。3回製造した結果、0.42, 0.51, 0.46%とほぼ一定量のGABAの蓄積が確認できた。ただし、茶葉の外観は赤味を帯びダマが目立ち、酸味と発酵臭があった。

## 考 察

GABA生産性の高い乳酸菌を検索した。GABA生産菌の検索は選択性を上げるため、普通に販売されているキムチにMSGを添加して25℃、7日間培養した培養物から検索した。キムチを追加培養することによりエネルギー源である糖質不足を引き起こし、添加したグルタミン酸を効率的にエネルギーとして利用できる乳酸菌の選択的増加を期待したためである。その結果、GABA生産性の高い菌を3種類分離することができ、中でも*L. brevis* L12が最もGAD活性が高かった。今回分離した*L. brevis* L12に加えて既存の乳酸菌の中でもGABA生産能力が高い*L. brevis* IFO12005及び*L. hilgardii* K3を用い検討した。*L. brevis*

L12及び、他の乳酸菌 (*L. brevis* IFO12005, *L. hilgardii* K3) の茶懸濁液中でのGABAの蓄積は、グルコースの有無で大きく異なることがわかった。

工業的生産においては、できるだけ水分の少ない条件で培養することが乾燥コストや培養体積の面から望ましいと考えられている。しかし、茶葉を用いた培養においては、水分が少ないと乳酸菌の生育が阻害されるだけでなく、茶カテキンによる生育阻害や酵素活性低下等の影響が懸念される。そこで、*L. brevis* L12における茶葉中の水分含量と繁殖の関係、そしてGABA生産に与える影響について検討した。その結果、L12は茶葉含量50%（粘土状の固体）でもグルコース無添加で十分繁殖しGABAを蓄積することが分かった。GABA蓄積量は10%茶懸濁液に比べると1/3ではあるが、低水分でも乳酸菌が繁殖し、かつ、GABAが蓄積することは、工業的生産において乾燥コストを考慮すると非常に有力な生産手段であると考えられる。ただし、水分の減少とともにGABA蓄積量の減少やばらつきが増大が見られ、今後検討する余地がある。

つづいて、カテキンとGABA生産の関連について検討した。森ら<sup>14)</sup>によれば、*L. brevis* IFO 12005等の3種類の乳酸菌において、通常の乳酸菌培養条件（グルコース含有）下で4.3mg/mlの茶タンニン（カテキンを含む茶ポリフェノール類）を添加すると、生育阻害はないが、GABA生産能力の90%以上が阻害され、GABAがほとんど生産されないことが報告されている。一方、図5に示すように、*L. brevis* IFO 12005は10%茶葉懸濁液中（カテキン濃度 6 mg/mL）、グルコース無添加でGABAを蓄積した。また、*L. brevis* L12は50%含水茶葉中での非常に高いカテキン濃度（約30mg/mL）においてもGABAを生成し、10%茶葉懸濁液中の1/3量（乾燥茶葉換算）を蓄積した。このように今回、グルコースを無添加にすることにより、高濃度カテキン下

でも高いGABA生産能力を維持できることが判明した。

さらに、GABAがよく蓄積した10%茶懸濁液中で、pHと糖の有無がGABAの蓄積やGAD生成に与える影響について検討した。*L. brevis* L12は茶懸濁液中で酸性(pH3.5)、中性(pH6)ともに、グルコース無添加でよく生育し、GABAも蓄積した。しかし、グルコースを添加した場合、酸性では生育が阻害され、また、酸性でも中性でも、グルタミン酸は大幅に減少したにもかかわらずGABAの蓄積はほとんど見られなかった。

乳酸菌ではグルタミン酸の細胞内への取り込み、グルタミン酸からGABAへの変換、GABAの細胞外への放出とそれに伴うプロトンの取り込みにより、アデノシン三リン酸(ATP)が生産されることが報告されており<sup>15)</sup>、GABA生成はエネルギー生産に関与する可能性が高いことが示唆されている。また、エネルギー生産では乳糖代謝がカタボライト抑制により、グルコース存在下で抑制されることもよく知られている。さらに、大腸菌においてはグルコース欠乏条件下で増加する環状アデノシン一リン酸(cAMP)が乳糖代謝を誘導していること、及び、そのcAMPがグルタミン酸からGABAを合成する酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)の誘導に関与していること<sup>16) 17) 18)</sup>が報告されている。乳酸菌*L. brevis* L12では作用機序は不明であるが、これらのことからグルコースによりGABAの生成が阻害されている可能性がある。

今回の検討結果をアミノ酸収支として捉えた場合、茶葉中のグルタミン酸とGABAの含有量は32及び1nmol/mgであったのに対し、グルコース無添加、中性条件下で4日発酵後では、11及び43nmol/mgであり、グルタミン酸の減少量(21nmol/mg)以上のGABAが蓄積されたことがわかる。乳酸菌はTCA回路が不完全なため<sup>19) 20) 21)</sup>、グルタミン酸を生産することはできないと考えられている。実際、

*L. brevis* L12はグルタミン酸がないと生育できないグルタミン酸要求株である。そこで、茶葉中のグルタミン酸誘導体に注目した。茶葉中のグルタミン酸のアミド誘導体であるグルタミンとテアニンの含有量はそれぞれ28及び154nmol/mgから、8及び63nmol/mgに減少しており、アミド誘導体がグルタミン酸を経てGABAとなっている可能性が示唆される。そこで、グルタミナーゼの至適pHにあわせ緩衝液をHEPES緩衝液(pH6.0)に変更して、乳酸菌粉砕液によるGABA生成量を測定した。その結果、乳酸菌1gにつきグルタミン酸を基質とした場合は1分間に6.9nmolのGABAを生成し、テアニンを基質とした場合は1分間に1.4nmolのGABAを生成した。今まで、テアニンはグルタミナーゼにより加水分解されるが、その活性は茶ポリフェノールで強く阻害される(1mg/Lで70%程度の阻害)ため<sup>22)</sup>、茶抽出物中でのテアニンの加水分解には脱ポリフェノール処理が必要であると報告されていた<sup>23)</sup>。しかし、今回の実験結果より*L. brevis* L12は茶葉懸濁液中でもグルタミナーゼによりグルタミンやテアニンを加水分解しグルタミン酸を生成し、茶葉に含まれていたグルタミン酸から理論的に推測される以上のGABAを生産している可能性が高いと考えられる。茶葉中のテアニンがGABA生産原料として使用可能であれば、テアニンの含有量は通常煎茶の場合でも約1.5%と、グルタミン酸の含有量の約4倍程度含まれており、テアニンをグルタミナーゼでグルタミン酸に変換した後、GABAの原料として使用できればGABAの生産に有効である。

以上を総括すれば、茶葉中でのGABAの生産を目的に、新たにGABA生産性の高い菌を検索し、乳酸菌*L. brevis* L12を得ることができた。さらに、*L. brevis* L12を10%茶懸濁液中で25℃4日間培養することにより、ギャバロン茶と同等のGABAを含む新しい加工茶を作ることが可能になった。ギャバロン茶では



原料である生葉の部位別にグルタミン酸含量に違いがあり、使用する部位や品種によりGABA生産量が異なることが報告されているが<sup>24) 25)</sup>、製造工程上生葉の部位選別や使用部位決定のための生葉の分析は困難であった。しかし、今回開発したプロセスでは選別した茶葉の使用が可能であるため、原料に茎等のグルタミン酸やその誘導体であるテアニンやグルタミンの豊富な部位を使用することが可能になった。また、茶葉中のグルタミン酸から理論変換量以上のGABAが得られた。原因として、茶葉中のグルタミン酸のアミド誘導体がグルタミン酸を経てGABAとなっている可能性が示唆された。

### 要 旨

乳酸菌による茶葉中での $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)の生産を目的に、新たにGABA生産性の高い菌を検索すると共に、乳酸菌の茶葉中での生育条件とGABA生産及び緑茶カテキンの変化について検討した。

その結果、GABA生産性の高い乳酸菌*L. brevis* L12を得ることができた。さらに、*L. brevis* L12を10%茶懸濁液中で25℃、4日間培養することにより、ギャバロン茶とほぼ同量のGABAを含む新しい茶を作ることが可能になった。しかし、乳酸菌の生育向上の為にグルコースを添加した場合、GABAは生成しなかった。

GABAの豊富な茶葉生産時、茶葉中のグルタミン酸から理論変換量以上のGABAが得られた。原因として、茶葉中のグルタミン酸のアミド誘導体がグルタミン酸を経てGABAとなっている可能性が示唆された。

### 引用文献

- 1) 澤井祐典(2008)：GABA茶の製造技術とその改良. *New Food Industry*, 50(9)31-42.
- 2) 林智・斉藤ひろみ・大森正司・猪俣智夫・加藤みゆき・澤井祐典・深津修一・袴田勝弘(2000)：食塩負荷ラットの血圧および腎機能におよぼす嫌気処理茶(ギャバロン茶)の影響. *家政学会誌*, 51, 265-271.
- 3) 大森正司(1987)：嫌気処理緑茶(ギャバロン茶)による高血圧自然発症ラットの血圧上昇抑制作用. *日本農芸化学会誌*, 61(11), 1449-1451.
- 4) 津志田藤二郎(1990)：茶生葉におけるアミノ酸代謝の解明とその利用による新製品。(ギャバロン茶)の開発茶研報, 72, 43-51.
- 5) 袴田勝弘他(1988)：嫌気処理緑茶(ギャバロン茶)の製法改善--嫌気処理条件の検討. *茶研報*, 68, 8-13.
- 6) 高柳博次・山下正隆(1991)： $\gamma$ -アミノ酪酸生成における品種間差異と熟度の関係. *茶研報*, 74(別), 114-115.
- 7) 上野義栄・平賀和三・森義治・小田耕平(2007)：漬物から $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)高生産性乳酸菌の分離とその応用. *生物工学会誌*, 85(3), 109-114.
- 8) 早川潔・上野義栄・河村真也・谷口良三・小田耕平(1997)：乳酸菌による $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)の生産. *生物工学会誌*1997, 75, 239-244.
- 9) Kato, Y., Furukawa, K. and Hara, S. (2002)：Cloning and nucleotide sequence of the glutamate decarboxylase-encoding gene *gadA* from *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(12), 2600-5.
- 10) Coleman, S. T., Fang, T. K., Rovinsky, S. A., Turano, F. J. and Moye-Rowley, W. S. (2001)：Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 276(1), 244-50.
- 11) 岡田早苗, 高橋尚人, 小原直弘, 内村泰, 小崎道雄, 日本産微生物発酵茶に関する微生物 第二報 碁石茶の発酵に関する

- 微生物. 食科工 1996, 43, (9), 1019-1027.
- 12) Jeng, K. C., Chen, C. S., Fang, Y. P., Hou, R. C. and Chen, Y. S. (2007) : Effect of Microbial Fermentation on Content of Statin, GABA, and Polyphenols in Pu-Erh Tea. *J Agric Food Chem*, 55(21), 87-92.
  - 13) Ikegaya, K., Takayanagi, H. and Anan, T. (1990) : Method of tea analysis. 茶研報 1990, 71, 43-74.
  - 14) 森久子・渡辺恭子・磯貝義員(2007) : 茶抽出物中で $\gamma$ アミノ酪酸を生成する乳酸菌*L.brevis* mh4219の分離とそれを用いた発酵茶飲料のストレス軽減効果. 生物工学会誌, 85, (12), 521-526.
  - 15) Higuchi, T., Hayashi, H. and Abe, K. (1987) : Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *J Bacteriol*, 179(10), 3362-4.
  - 16) Coldewey, S. M., Hartmann, M., Schmidt, D. S., Engelking, U., Ukena, S. N. and Gunzer, F. (2007) : Impact of the *rpoS* genotype for acid resistance patterns of pathogenic and probiotic *Escherichia coli*. *BMC Microbiol*, 7, 21.
  - 17) Castanie-Cornet, M. P. and Foster, J. W. (2001) : *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes. *Microbiology*, 147, (Pt 3), 709-15.
  - 18) Tramonti, A., Visca, P., De Canio, M., Falconi, M. and De Biase, D. (2002) : Functional characterization and regulation of *gadX*, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J Bacteriol*, 184 (10), 2603-13.
  - 19) Williams AG., Noble J., and Banks JM (2004) : The effect of alpha-ketoglutaric acid on amino acid utilization by nonstarter *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Lett Appl Microbiol*. 38(4), 289-95.
  - 20) Helinck S., Le Bars D., Moreau D., and Yvon M., (2004) : Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl Environ Microbiol*. 70(7), 3855-61.
  - 21) Dudley EG., and Steele JL. (2005) : Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter lactobacilli. *J Appl Microbiol*. 98(1), 14-23.
  - 22) 杉本明夫・良辺文久・水流千夏(2005) :  $\gamma$ アミノ酪酸含有食品素材及びその製造方法. 公開特許公報(A). 5. 19, P2005-124500
  - 23) 加藤千夏・園田久泰(2003) : 甘い花香を有する $\gamma$ -アミノ酪酸高含有物の製造方法, および該方法により得られる, 甘い花香を有する $\gamma$ -アミノ酪酸高含有物. 公開特許公報(A). 11. 25, P2003-333990A.
  - 24) 佐波哲次・山下正隆・武弓利雄(1994) : 嫌気処理によるチャ新芽のアミノ酸変化の系統間差異. 茶研報, 79 (別冊), 94-95.
  - 25) 澤井祐典・小高保喜・吉富 均・山口優一・角川修・深山大介・竹内敦子(1997) : 嫌気処理した茶葉の葉位別アミノ酸含量, 茶研報, 85 (別冊), 78-79.