

サトウキビ搾汁粕から分離したGABA強化黒糖製造に利用可能な乳酸菌

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	44巻1号
掲載ページ	p. 17-21
発行年月	2018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



サトウキビ搾汁粕から分離したGABA強化黒糖製造に 利用可能な乳酸菌

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

Screening of Lactic Acid Bacteria for Production of GABA-Enriched Non-Centrifugal Brown Sugar “Kokuto”, Isolated from Sugar Cane Bagasse

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

Novel lactic acid bacteria *Enterococcus* sp. AG34 was isolated from sugar cane bagasse. AG34 was grown in sugar cane juice and produced γ -aminobutyric acid (GABA), for which addition of yeast extract was not necessary. AG34 was inoculated into sugar cane juice containing 0.2% sodium glutamate and cultured at 30°C. GABA-enriched *Kokuto* containing 357.4 mg GABA per 100 g *Kokuto* was made from juice that was fermented for 24 h. In addition, the data suggested that AG34 does not produce any substance that inhibits the solidification of *Kokuto*.

(Received Aug. 24, 2017 ; Accepted Nov. 8, 2017)

Key words : GABA, lactic acid bacteria, *Enterococcus* sp., non-centrifugal brown sugar, yeast extract
GABA, 乳酸菌, *Enterococcus*属, 黒糖, 酵母エキス

γ -アミノ酪酸 (GABA) は、血圧上昇抑制効果¹⁾や抗ストレス効果²⁾、睡眠の質改善効果³⁾、皮膚改善効果⁴⁾など多様な機能性が報告され、注目されている。このGABAは、各種微生物において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によって生成される⁵⁾。乳酸菌にGABAを生産する菌株⁶⁾が見出され、乳酸菌による発酵によりGABA含有量を高めた食品が開発されている⁷⁾。一方、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、GABAをはじめとするアミノ酸やミネラル⁸⁾、ポリコサノール類⁹⁾などサトウキビ由来の有用成分を豊富に含んでいる。執筆者らは黒糖の付加価値を高める目的で、*Lactobacillus brevis*を利用してGABA含有量を高めた黒糖の製造方法を開発した¹⁰⁾が、GABAを生産させるためには、前駆体であるグ

ルタミン酸ナトリウムに加え、酵母エキスの添加を必要とした。また、長時間発酵させた搾汁液では固形の黒糖が製造できないなどの課題が残された。そこで、サトウキビ搾汁粕 (バガス) より新規な乳酸菌を検索した結果、GABA強化黒糖の製造に適した乳酸菌を分離したので報告する。

実験方法

1. 供試材料

サトウキビ搾汁液およびサトウキビ搾汁液培地 (CJ培地) は前報¹⁰⁾と同様に調製した。グルタミン酸ナトリウム (和光純薬社製) および酵母エキス (ナカライ社製) は0.20 μ mのメンブレン (Minisart RC15, Sartorius社製) でろ過除菌し、加熱殺菌した培地に添加した。

*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

2. 乳酸菌のスクリーニング

岡田¹¹⁾は、乳酸菌の多くは厳しい栄養要求性を有しているため、植物質の培地を用いる場合には植物質の環境に生育する乳酸菌を選択するべきであると指摘している。そこで、サトウキビの搾汁で副生するサトウキビ搾汁粕をスクリーニング源とした。沖縄県粟国島の黒糖製糖工場で採取したサトウキビ搾汁粕1.0gを10mlの滅菌した生理的食塩水に懸濁し、段階希釈した後にアジ化ナトリウムおよびシクロヘキシミドを各10ppm添加したMRS白亜寒天培地¹²⁾に塗布した。30℃で4日間培養して透明なハロを形成したコロニーをBCP加プレートカウント寒天培地 (Merck社製) に移し、生酸性を有する菌株を分離した。分離株はMRS培地 (関東化学社製) で24時間培養し、以下の実験に供した。

分離株を、0.1%のグルタミン酸ナトリウム (MSG) を添加したCJ培地および0.1%のMSGと酵母エキス (YE) を添加したCJ培地にそれぞれ1%接種して30℃で48時間培養した。培養液に等量のエタノールを加えて遠心分離し、得られた上清の適量を薄層クロマトグラフ (セルロースF, Merck Millipore社製) 上にスポットして展開溶媒 (*n*-ブタノール:酢酸:水=3:2:1) で展開した後に、ニンヒドリン試薬 (和光純薬社製) を噴霧して加熱し、グルタミン酸とGABAのスポットを検出した。

乳酸菌の同定は、生化学的性状判定キット (アピストレップ20プレート, シスメックス・ビオメリュー社製) および16S rDNAの塩基配列を用いた遺伝子解析¹³⁾ によった。

CJ培地でGABAを生産する対照菌株として、*L. brevis* NBRC 3345¹⁰⁾ (以下、NBRC 3345と表記) を用いた。

3. GABA産生条件の検討

MRS培地を用いて30℃で24時間培養した培養液をCJ培地に1%接種し、30℃で24時間前培養した培養液をさらにCJ培地に1%接種して30℃で24時間培養したものをスターターとして用いた。

発酵温度の検討では、0.1%のMSG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72時間培養し、培地中のGABA濃度を分析した。MSG添加濃度の検討では、MSG添加濃度を0.05~1.0%として60時間培養し、同様に培地中のGABA濃度を分析した。

4. GABAを強化した黒糖の試作

乳酸菌で発酵させた搾汁液を用いた黒糖の試作方法、およびアミノ酸や糖組成の分析方法は、前報¹⁰⁾ に従った。

実験結果と考察

1. GABA強化黒糖製造に利用できる乳酸菌のスクリーニング

サトウキビ搾汁粕よりMRS白亜寒天培地およびBCP加プレートカウント寒天培地を用いて乳酸菌と考えられる菌株を200株分離した。これら分離株をMSG添加CJ培

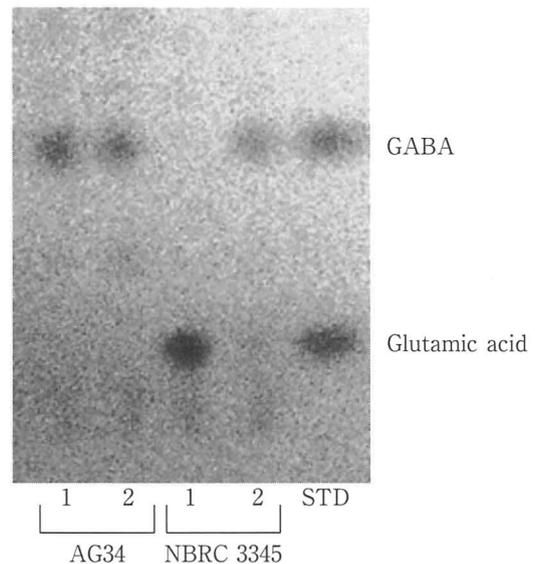


Fig. 1 Determination of GABA production by TLC

The cultures were incubated at 30℃ for 48 hr. Sugar cane juice containing 0.1% sodium glutamate (1) or 0.1% sodium glutamate and yeast extract (2) was used as the culture medium.

地およびMSG・YE添加CJ培地に接種して30℃で48時間培養し、得られた培養上清をTLC分析した結果、GABAを生産する菌株AG34を見出した (Fig. 1)。既報¹⁰⁾ のとおりNBRC 3345はYEを添加していないCJ培地ではGABAを生産しなかった。一方で、AG34はYE無添加のCJ培地においてGABAを生産する菌株であることが示された。次に、CJ培地にMSGのみを添加してAG34を培養し、CJ培地にMSGとYEを添加したNBRC 3345の培養と比較したところ、いずれも菌体の増殖が定常期に達するとともにグルタミン酸の減少とGABAの増加が見られた (Fig. 2)。AG34の定常期における生菌数はNBRC 3345の1/10程度であった。また、培養24時間におけるGABA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mol数) もNBRC 3345の98%に対して80%と低くなった。一方で、YEは調味料でもあり、YE添加による味への影響が懸念されるほか、製造コストも上昇する。したがって、GABA生産にYE添加が不要なAG34は、これらの面からも有利であると思われた。

AG34は、グラム陽性の球菌であった。そこで、腸球菌用生化学的性状判定キットによる同定試験の結果、*Enterococcus avium*と99.8%の高い同定確率を示した。次に、16S rDNAの塩基配列約1500bpを用いてDDBJ (DNA Data Bank of Japan, 静岡県三島市) における相同性を検索した結果、*E. malodoratus* ATCC43197^T, *E. pseudoavium* ATCC49372^Tおよび*E. avium* ATCC14025^Tに対して、それぞれ99.7%の高い相同率を示したが、簡易分子系統解析ではクラスターを形成する既知種が認められなかった (Fig. 3)。これらの結果より、AG34は*E.*

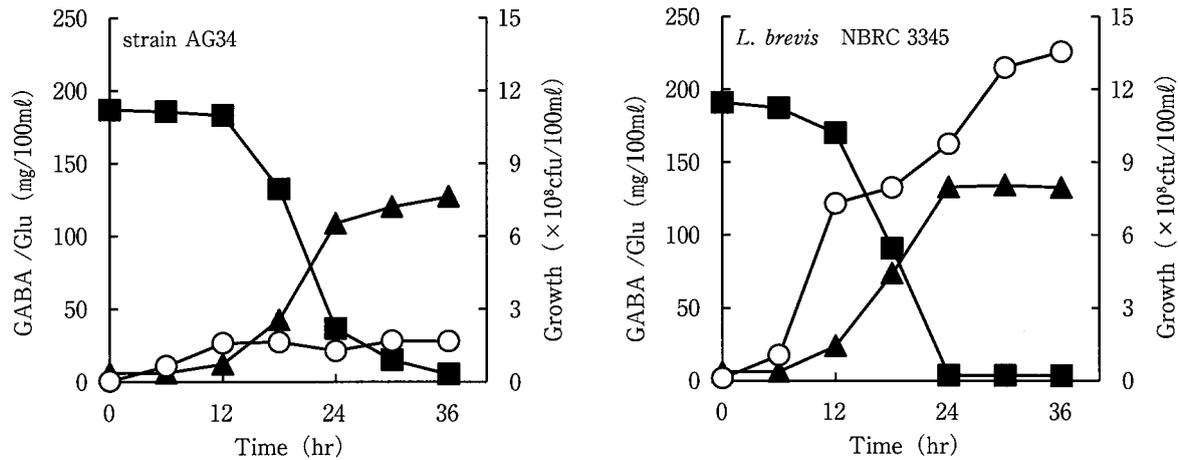


Fig. 2 Comparison of GABA production by isolated strain AG34 and *Lactobacillus brevis* NBRC 3345

L. brevis NBRC 3345 was used as known GABA-producing lactic acid bacteria. Sugar cane juice containing 0.2% sodium glutamate (and yeast extract for NBRC 3345) was used as the culture medium.

(○ : growth, ▲ : GABA, ■ : Glu)

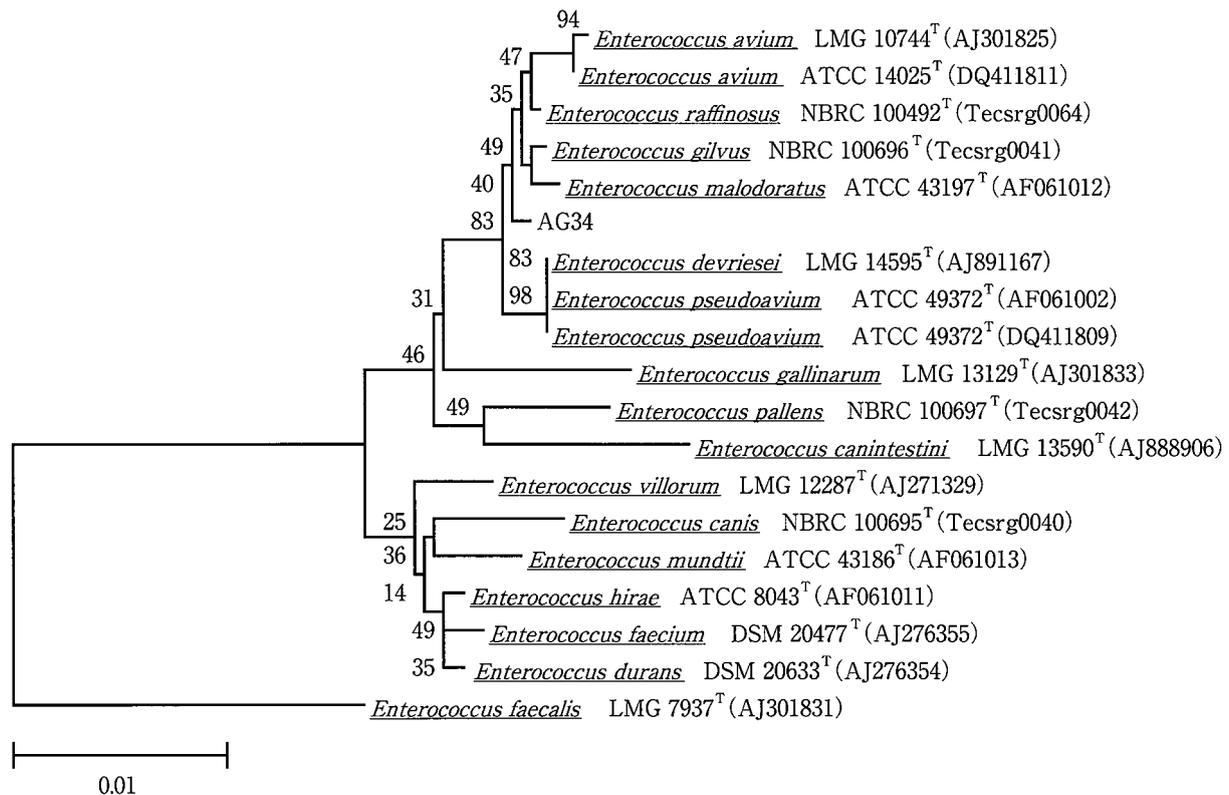


Fig. 3 Phylogenetic analysis by 16S rDNA

Bootstrap values are shown.

*avium*に極めて近縁な*Enterococcus*属の乳酸菌であると推定した。TAMURAらはニンジン葉よりGABAを生産する*E. avium*を分離しており¹⁴⁾、AG34も類似した菌株であると思われた。*Enterococcus*属の乳酸菌は、病原性は低いものの日和見感染や薬剤耐性遺伝子の水平伝播が危惧される¹⁵⁾。黒糖の製造工程にはライミングによるタンパク質の除去や130℃までの加熱操作があり¹⁰⁾、この過程で乳酸菌は死滅し除去されるものと考えているが、実用

に際しては詳細な評価が必要である。

2. GABA産生条件の検討

AG34は培養温度30~40℃では培養24時間でGABA生産がほぼ停止したが、25℃ではGABAの生産が遅くなった (Fig. 4-(a))。次に培養温度30℃でMSG添加濃度を検討したところ、添加濃度0.1%では培養12時間、0.2%では24時間でGABA生産が停止し、生産効率がほぼ100%に達したが、0.5%添加では培養36時間、1.0%添加では

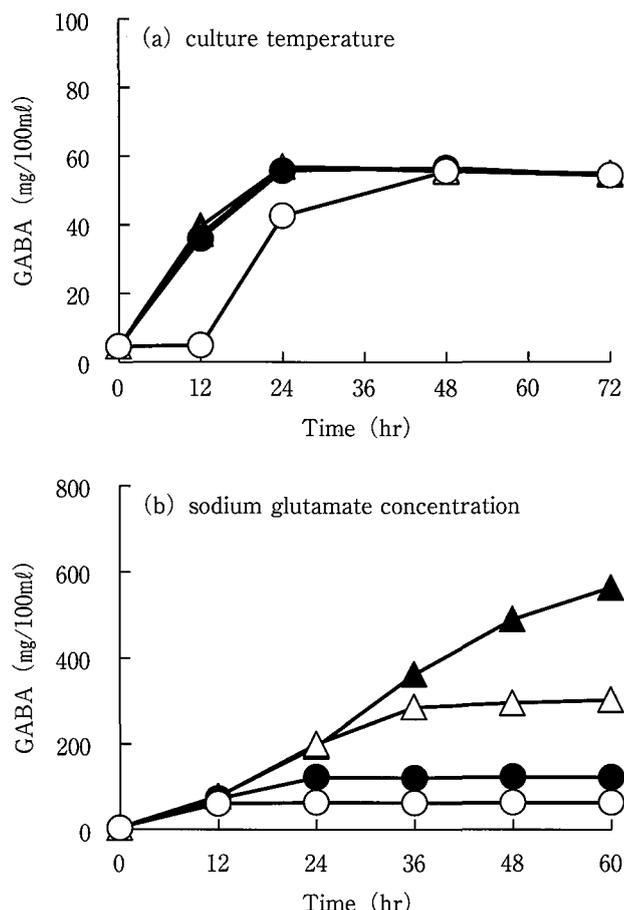


Fig. 4 Effect of culture temperature (a) and sodium glutamate concentration (b) on GABA production by AG34

(a) Sugar cane juice containing 0.1% sodium glutamate was used as the culture medium. Culture temperature: ○, 25°C; ●, 30°C; △, 35°C; ▲, 40°C.

(b) The cultures were incubated at 30°C. Sodium glutamate content: ○, 0.1%; ●, 0.2%; △, 0.5%; ▲, 1.0%.

培養60時間で停止し、各々のGABA生産効率は87%および78%にとどまった (Fig. 4-(b))。これらの結果より、AG34におけるGABA産生の最適培養条件は30°Cで24時間、MSG添加濃度は0.2%とした。

3. GABAを強化した黒糖の試作

AG34で発酵させたCJ培地を用いて黒糖を試作したところ、GABAを 357.4 ± 3.9 mg/100 g DW (平均値±標準誤差, $n = 4$) 含有する、硬い黒糖を製造することができた。既報¹⁰⁾のとおり、NBRC 3345では30時間以上発酵させたサトウキビ搾汁液を用いると、固形の黒糖を製造できなかった。そこで、AG34とNBRC 3345で24時間培養した培養液の糖組成を分析したところ、NBRC 3345の培養液にはAG34では検出されない、マンニトールと溶出時間が一致するピークが出現した (Fig. 5)。 *L. brevis* はマンニトールを生産すること¹⁶⁾や、マンニトールがショ糖の結晶化を阻害することが報告されている¹⁷⁾ことから、NBRC 3345は発酵時にマンニトールを生産し、黒

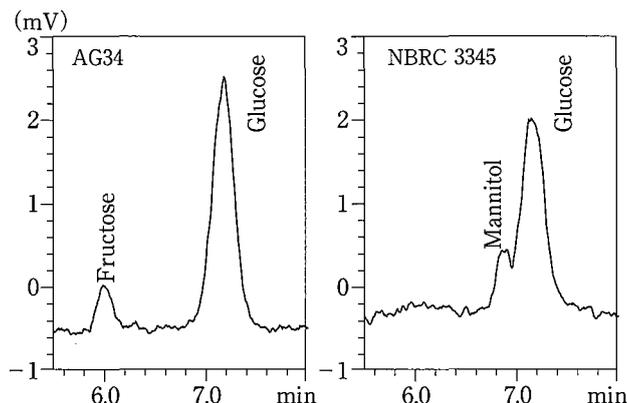


Fig. 5 Comparison of HPLC chromatogram

0.2% of sodium glutamate (AG34) or 0.1% of sodium glutamate and yeast extract (NBRC 3345) were added to sugar cane juice and incubated at 30°C for 24 hr.

糖の固形化を妨げる一因である可能性が考えられた。微生物によるサトウキビ搾汁液の品質劣化要因には、多糖類の産生や純糖率の低下が知られており¹⁸⁾、検討が必要である。

以上の結果より、サトウキビ搾汁粕より分離した *Enterococcus* 属の乳酸菌AG34は、GABAの生産にYEの添加を必要とせず、黒糖の固形化を妨げる物質も生産しない、GABA強化黒糖の製造に適した菌株であることが明らかとなった。

要 約

サトウキビ搾汁粕より、GABAを生産する *Enterococcus* 属の乳酸菌AG34を分離した。AG34は、GABAの生産に酵母エキス添加を必要としなかった。サトウキビ搾汁液にグルタミン酸ナトリウムを0.2%添加した培地にAG34を接種して30°Cで24時間発酵させた後に製糖すると、GABAを357.4 mg/100 g 含有する黒糖を製造することができた。また、AG34は黒糖の固形化を妨げる物質を生産しないことが示唆された。

謝 辞 本研究は、高付加価値黒糖市場性調査に係るサンプル製造委託事業 (沖縄県黒砂糖協同組合) において実施した。16S rDNAの塩基配列を用いた遺伝子解析は、(株)テクノスルガ・ラボ (静岡県静岡市) に委託した。

文 献

- 1) INOUE, K., SHIRAI, T., OCHIAI, 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 外菌英樹・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)
- 5) HIGUCHI, T., HAYASHI, H. and ABE, K.: Exchange of glutamate and γ -aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain, *J. Bacteriol.*, **179**, 3362~3364 (1997)
- 6) 早川 潔・上野義栄・河村真也・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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 広瀬直人・前田剛希・照屋 亮・高良健作・和田浩二：乳酸発酵によってGABAを強化した黒糖の開発，日食保蔵誌，**43** (6)，269~273 (2017)
- 11) 岡田早苗：植物性乳酸菌世界とその秘めたる可能性，日乳酸菌会誌，**13** (1)，23~36 (2002)
- 12) 内村 泰・岡田早苗：乳酸菌の分離法，乳酸菌実験マニュアル (朝倉書店，東京)，pp. 8~17 (1992)
- 13) 浜田盛之・鈴木健一郎：何から始めよう微生物の同定：細菌・アーキア編，生物工学誌，**89** (12)，744~747 (2011)
- 14) TAMURA, T., NODA, M., OZAKI, M., MARUYAMA, M., MATOBA, Y., KUMAGAI, T. and SUGIYAMA, M.: Establishment of an efficient fermentation system of gamma-aminobutyric acid by a lactic acid bacterium, *Enterococcus avium* G-15, isolated from carrot leaves, *Biol. Pharm. Bull.*, **33** (10), 1673~1679 (2010)
- 15) 林 篤・嶋田貴志・尾仲宏康・古米 保：富山湾深層水からの*Enterococcus*属乳酸菌の分離と諸性状の検討，乳酸菌誌，**18** (2)，58~64 (2007)
- 16) YUE, M., CAO, H., ZHANG, J., LI, S., MENG, Y., CHEN, W., HUANG, L. and DU, Y.: Improvement of mannitol production by *Lactobacillus brevis* mutant 3-A5 based on dual-stage pH control and fed-batch fermentations, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **29** (10), 1923~1930 (2013)
- 17) EGGLESTON, G., YEN, J.W.T., ALEXANDER, C. and GOBER, J.: Measurement and analysis of the mannitol partition coefficient in sucrose crystallization under simulated industrial conditions, *Carboty. Res.*, **355** (10), 69~78 (2012)
- 18) NEL, S.: Microbial diversity profiling in sugarcane processing: what, why and how?, *Proc. S. Afr. Technol. Ass.*, **87**, 246~254 (2014)
- (平成29年8月24日受付，平成29年11月8日受理)