

[生物工学会誌 第84巻 第12号 479-483, 2006]

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

大友 理宣^{1*}・木村 貴一²・渡辺 誠衛²・戸枝 一喜²

秋田銘醸株式会社¹, 秋田県農林水産技術センター総合食品研究所²

(¹ 〒012-0814 秋田県湯沢市大工町 4-23, ² 〒010-1623 秋田市新屋町砂奴寄 4-26)

(平成18年5月23日受付 平成18年10月17日受理)

Production of Components Containing γ -Aminobutyric Acid from Rice Bran by *Lactobacillus brevis* IFO12005

MASANOBU OHTOMO^{1*}, KIICHI KIMURA², SEIEI WATANABE², and KAZUKI TOEDA² (*Akitameijyo Co., Ltd., 4-23 Daikumachi, Yuzawa, Akita 012-0814*¹ and *Akita Research Institute for Food and Brewing, 4-26 Sanuki, Arayamachi, Akita 010-1623*²) *Seibutsu-kogaku* **84**: 479-483, 2006.

An efficient technique for production of γ -aminobutyric acid (GABA) using *Lactobacillus brevis* IFO12005 and rice bran was examined. GABA was produced with a conversion rate of more than 90% from monosodium glutamate (MSG) by *L. brevis* IFO12005 using a culture medium which contained rice bran as the sole source of nutrition. However, when the MSG content of the rice bran was more than 8%, the conversion efficiency to GABA fell. The enzyme processing of the rice bran medium (RB medium) was very effective for GABA production. GABA was produced with a conversion rate of more than 95% by *L. brevis* IFO12005 using the enzyme-treated RB medium and 16% MSG. GABA was produced with a conversion rate of 1.4% using a 30 l jar fermentor containing 20 l of RB medium.

[**Key words:** γ -aminobutyric acid (GABA), *Lactobacillus brevis* IFO12005, rice bran, rice bran medium]

食品副産物である米糠の有効利用は重要な問題とされている。清酒の製造工程から排出される米糠（精米かす）は、玄米の外層側から30%（w/w）の部分の米糠だけでも、その量は全国で年間9万トンにも達する。さらに、私たちが普段食している白米の精米において排出される米糠を含めると莫大な量と推測され、そのほとんどが家畜飼料、堆肥、米糠油脂などに利用されている。しかし、この副産物である米糠には良質な油脂、タンパク質、ビタミン、食物繊維などの機能性成分が豊富に含まれていることから発酵原料としても有望であるが、現状は十分に活用されているとは言えない。

一方、 γ -アミノ酪酸（GABA）は動植物界¹⁾に広く分布し、血圧降下作用²⁾や精神安定作用³⁾を持つことが知

られている。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⁴⁻⁹⁾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^{10,11)}について報告されているが、米糠を発酵原料としGABAを富化させる研究について報告はない。

本報では、米糠を唯一の栄養素とした培地を調製し、乳酸菌 *Lactobacillus brevis* IFO12005 を用いて発酵によるGABA含有組成物の生産を目的とした。米糠の前処理法の検討および培養条件の検討を行った結果、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1%以上のGABA含有組成物の生産法を開発したので報告する。

*連絡先, Corresponding author.
TEL. 0183-73-3161 FAX. 0183-72-3247
E-mail: kenkyu@ranman.co.jp

実験方法

実験試料 秋田銘醸株式会社にて酒造工程の精米

(玄米から15%精米部分)に排出した秋田県産米のあきたこまち(一般米), めんこいな(一般米), 秋田酒こまち(酒米)の米糠3種を用いた。グルタミン酸モノナトリウム・一水和(MSG)は和光純薬製を用い, 米糠重量に対して8~16%添加した。

アミノ酸分析 試料液5.0 mlに40%トリクロロ酢酸0.8 mlを添加後, 遠心分離(2900×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(日本電子社製)を用いて分析した。

GABA変換率 GABA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。

糖分析 米糠酵素処理によって可溶化される単糖の分析はDX-500(ダイオネクス社製)高性能陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC-PAD)を用いて行った。

菌数の測定 試料原液を予想菌数に応じて減菌水を用いて希釈し, 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)を用いて35°Cで3日間培養し, 菌数を測定した。一般生菌数はACプレート(3M社製)を用いて35°Cで4日間培養し, 測定した。

使用菌株と培養法 乳酸菌は*L. brevis* IFO12005を用いた。保存培地はMRS培地(Difco製)を用いた。前培養培地には, GY液体培地[グルコース2%, 酵母エキス1%(酵味, 武田キリン食品製), MSG 1%]を用い, 30°C, 2日間静置培養後に用いた。前培養液を米糠培地の米糠重量に対し4%(v/w)添加した。

米糠混合液によるGABA生産 米糠20 g, 水75 mlの混合液を90%乳酸でpH4.5に調整し, 加圧滅菌(121°C, 15分)した培地に, 別途にて加熱殺菌したMSG溶液5.0 ml(MSG 1.6 g/5 ml)を加え, 前培養液を接種し, 30°C, 4~6日間の攪拌培養(50 rpm)をした。経時的にGABA, グルタミン酸濃度および乳酸菌数を測定した。

米糠の酵素処理による培地の検討 米糠20 g, 水80

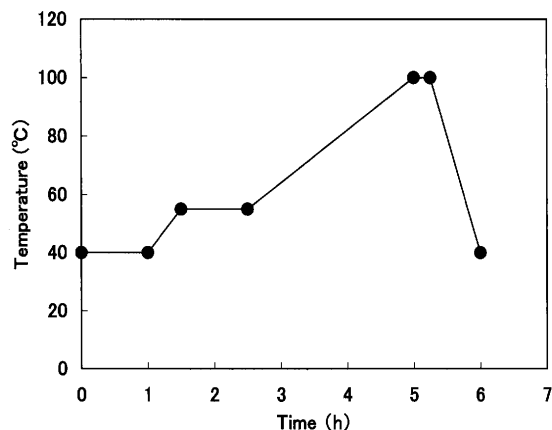


Fig. 1. Program of rice bran enzyme processing.

mlの混合液(pH4.5)を, 市販酵素剤の液化アミラーゼ酵素剤YA(天野製薬), タンパク分解酵素剤デナブシン10P(ナガセケムテック), 繊維分解酵素剤ベクチナーゼナガセ(ナガセケムテック), 脂肪分解酵素剤リリパーゼA-10FG(ナガセケムテック)を米糠重量に対して, それぞれ1/1000を加え, 攪拌しながらFig. 1に示した昇温プログラムで酵素処理した。

酵素処理培地によるGABA生産 30 lジャー培養装置MSJ-N₂型(丸菱バイオエンジニアリング製)を用いて, あきたこまち米糠4 kg, 水16 lの米糠混合液(pH4.4)の酵素処理を行い, 酵素処理後に8%MSG, 前培養液を加え, 30°Cで7日間の攪拌(50 rpm)培養を行った。培養終了後に米糠培養液の固液分離について検討した。経時的にGABA, グルタミン酸濃度および乳酸菌数を測定した。

実験結果と考察

米糠混合液によるGABA生産 GABAの生成に関与する*L. brevis* IFO12005のGADの至適pHは4.2と報告^{12,13)}されているが, 本研究では, 現場醸造も考慮し, 米糠培地をpH4.5以下に調整し, 常圧加熱による滅菌およびGAD活性の至適pHによるGABA生産の最適化を目的とした。

米糠混合液(pH4.5)における*L. brevis* IFO12005培養によるGABA生産の経時変化をFig. 2に示した。

培養初発のグルタミン酸濃度15.45 mg/mlからGABAの生産量は, 培養2日目で1.02 mg/ml, 4日目で8.63 mg/mlが確認され, MSGからGABAへの変換率が, 培養4日目で79.7%に達した。さらに, 米糠に対するMSG添加濃度の違いによるGABA変換率は, 8%以上のMSG添加濃度で低下した(データ示さず)。以上の結果から, 米糠(あきたこまち)を唯一の栄養源として*L. brevis* IFO12005培

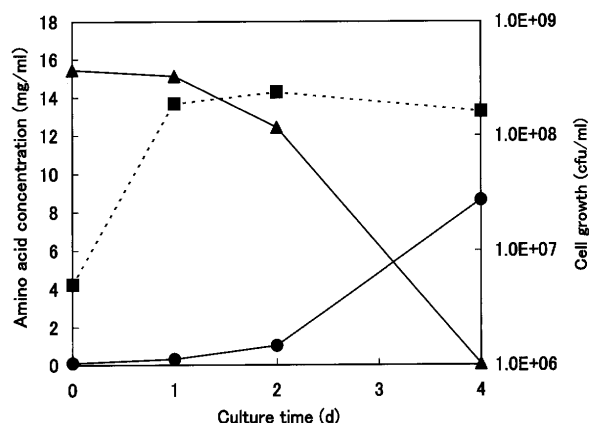


Fig. 2. Production of GABA from MSG by *Lactobacillus brevis* IFO12005 using bran of *Akitakomachi* rice. Glutamic acid and *L. brevis* IFO12005 were added to the rice bran liquid mixture (rice bran: water = 1 : 4) and cultivated for 6 d at 30°C. Symbols: ●, GABA; ▲, glutamic acid; ■, cell growth.

養によるGABA生産が可能であることが判明した。

さらに、あきたこまち、めんこいな、秋田酒こまちの3品種の異なる米糠混合液における*L. brevis* IFO12005培養によるGABA生産、変換率についてTable 1に示した。各米糠の最大GABA生産量および変換率は、あきたこまち9.02 mg/ml, 90.8% (培養6日目), めんこいな9.02 mg/ml, 100% (培養4日目), 秋田酒こまち8.81 mg/ml, 95.8% (培養4日目)となり、品種の異なる米糠混合液によるGABAの生産に顕著な差は認められなかった。このことから、米糠の品種の違いはGABA生産性に影響を及ぼさないことが明らかになった。

米糠の酵素処理 米糠混合液の更なる栄養源の増加を目的に、あきたこまち、秋田酒こまちの米糠に対して酵素処理の検討を行った。酵素処理後の米糠混合液中のアミノ酸および糖組成についてTable 2に示した。

米糠混合液の遊離アミノ酸総量は、酵素未処理の米糠混合液に比べ2倍以上に増加し、糖組成についても酵素処理によって、本菌が利用可能なグルコース、フラクトース、マルトースなどの炭素源が増加した。以後の試験には、酵素処理米糠をGABA生産用米糠培地 (RB 培地; rice bran medium) として用いた。

RB 培地によるGABA生産 RB 培地 (米糠: 水=1:4) の加水割合を1:4~6に変化させた培地 (RB1: 4~6)

に対して8%MSGと前培養液を加え、30°Cで4日間の攪拌培養 (50 rpm) によるGABA生産、変換率および乳酸菌数についてFig. 3に示した。

各RB 培地のGABA変換率はRB1: 6で83.4%, RB1: 5

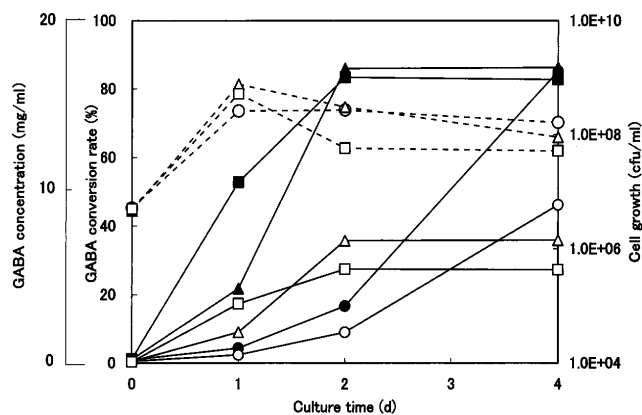


Fig. 3. Effect of ratio of rice bran and water in medium on production of GABA. The rice bran liquid mixture was cultivated for 4 d at 30°C with addition of glutamic acid and *Lactobacillus brevis* IFO12005 to alter hydration rate. Symbols for GABA concentration: rice bran : water = 1 : 4 (—○—), rice bran : water = 1 : 5 (—△—), rice bran : water = 1 : 6 (—□—); symbols for GABA conversion rate: rice bran : water = 1 : 4 (---●---), rice bran : water = 1 : 5 (---▲---), rice bran : water = 1 : 6 (---■---); symbols for *L. brevis* IFO12005 cell growth: rice bran : water = 1 : 4 (····○····), rice bran : water = 1 : 5 (····△····), rice bran : water = 1 : 6 (····□····).

Table 1. GABA production with different rice bran media.

Culture time (d)	<i>Akitakomachi</i>		<i>Menkoina</i>		<i>Akitasakekomachi</i>	
	(mg/ml) ^a	(mol %) ^b	(mg/ml) ^a	(mol %) ^b	(mg/ml) ^a	(mol %) ^b
0	0.09	0.92	0.15	1.71	0.22	2.42
4	8.29	83.5	9.02	100	8.81	95.8
6	9.02	90.8	8.57	95.9	8.74	95.1

^aGABA concentration, ^bconversion rate.

Glutamic acid and *Lactobacillus brevis* IFO12005 were added to the rice bran liquid mixture and cultivated for 6 d at 30°C.

Table 2. Amino acid and sugar-composition of rice bran processed with enzyme mixture.

Rice bran	Enzyme process	Amino acids (mg/g)	Sugar (mg/g)			
			Glucose	Fructose	Sucrose	Maltose
<i>Akitakomachi</i>	—	0.93	3.55	3.59	3.29	1.93
	+	2.55	9.63	5.18	0.23	2.04
<i>Akitasakekomachi</i>	—	0.81	3.77	3.47	3.40	0.09
	+	1.80	10.85	5.08	2.71	1.03

Enzyme processing method according to program of Fig. 1.

で86.0%と培養2日目で最大値に達し、RB1:4では、培養4日目で85.2%の最大値に達した。このことから、RB培地の加水比率を米糠に対して5倍以上に増加させることによって、GABA変換速度に顕著な差が認められた。

さらに、乳酸菌増殖については、各培地とも培養1日目で菌体数が最大に達したが、RB1:4で 2.8×10^8 cfu/mlに対して、RB1:5で 4.4×10^8 cfu/ml、RB1:6で 4.3×10^8 cfu/mlと菌体数が1.5倍であることが確認された。これはRB培地に対する酵素処理、加水比率の増加によって培地の粘性の低下、菌体増殖に利用されるアミノ酸、炭素源の増加および、未確認ではあるが他の栄養源の増加によって、GABA変換速度および菌体増殖が促進されたと推測される。

RB培地のMSG添加量の影響 RB培地（米糠：水＝1：6）に8～16%MSGおよび前培養液を加え、30℃で3日間の静置培養によるGABA生産の経時変化をFig. 4に示した。

培養1日目におけるGABA生産は、12%MSG区で8.75 mg/ml、16%MSG区で11.92 mg/mlが確認され、両区ともに95%以上のGABA変換率であった。さらに、培養中における培地pHの経時変化は12%MSG区でpH4.83～5.28、16%MSG区では4.97～5.55と培養3日目間で急激な増加傾向であった。

一方、8%MSG区では、培養1～2日目で2.83～6.40 mg/mlのGABA生産が得られ、GABA変換率も培養2日目で95%以上であった。RB培地のpHも、培養3日目間でpH4.73～4.81と緩やかな増加傾向を示した。RB培地のMSG濃度増加によって、培地のpHが増加したため、*L. brevis* IFO12005の生育が旺盛になり、その結果MSGからGABAの変換率が向上したものと考えられる。

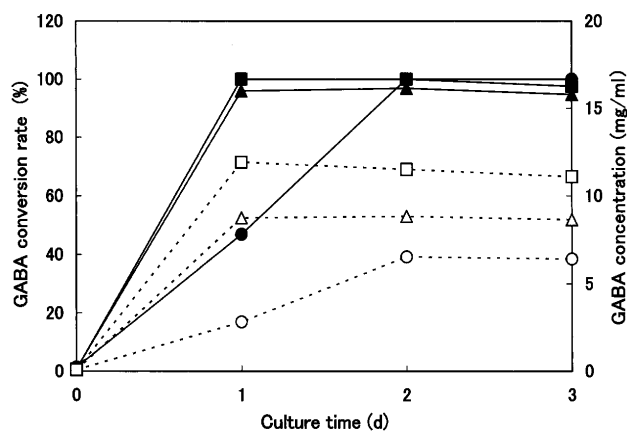


Fig. 4. Effect of MSG concentration on production of GABA. An 8% to 16% glutamic acid solution and *Lactobacillus brevis* IFO12005 were added to the enzyme-processed rice bran, which was cultivated for 3 d at 30°C. GABA conversion rate with 8% MSG (●), 12% MSG (▲), and 16% MSG (■); GABA concentration with 8% MSG (○), 12% MSG (△), and 16% MSG (□).

RB培地初発pHのGABA生産に対する影響 RB培地初発pHの影響によるGABA生産についてFig. 5に示した。

RB培地に対して16%MSGを加え、1N塩酸溶液にてpH4.0、4.7、5.3に調整後、前培養液を接種し、静置培養（30℃、3日間）した。培養3日目のGABA生産は、pH4.7区で3.02 mg/ml、pH5.3区で13.37 mg/mlを得られたが、pH4.0区ではGABAが未生産であった。さらにpH4.0、4.7区のpHの経時変化は、培養3日目までにpH4.00～3.95（pH4.0区）、pH4.70～4.58（pH4.7区）とほとんど変化はなく、pH5.3区のみpH5.30～7.08に急激に増加した。

また、pHの異なるRB培地における菌体増殖は、pH4.0区で最大菌数 8.3×10^7 cfu/mlに達し、pH4.7区および5.3区と比較し1/100少ないことから、菌体増殖の減少によりGABAが生産されなかったものと考えられる。一方、pH4.7区では 10^9 cfu/mlオーダーに達していたがGABA生産はpH5.3区の1/4以下であった。

以上の結果から、RB培地において、*L. brevis* IFO12005接種前の初発pHが4.7以上なければ、菌体増殖による菌体定常期に移行しても、GABAの生産は抑制されることが推測される。

GABA含有組成物の生産試験 30 lジャー培養装置を使用し、米糠4 kgスケールのRB培地によるGABA生産（35℃、7日間）についてFig. 6に示した。

RB培地のGABA変換率および菌体増殖は、培養3日目以内に最大（95%、 4.6×10^8 cfu/ml）に達し、GABA生産も14.10 mg/mlと最大値を確認した。次に、GABA含有組成物を調製するため、7日間の培養終了後のRB培養液における固液分離の最適化を検討した。固液分離には、

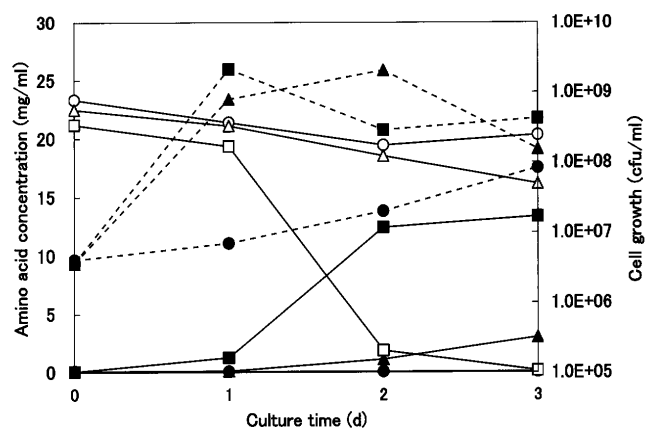


Fig. 5. Effect of initial pH condition on production of GABA. GABA concentration at pH4.0 (—●—), pH4.7 (—▲—), and pH5.3 (—■—); glutamic acid concentration at pH4.0 (—○—), pH4.7 (—△—), and pH5.3 (—□—); cell growth of *Lactobacillus brevis* IFO12005 at pH4.0 (—●—), pH4.7 (—▲—), and pH 5.3 (—■—).

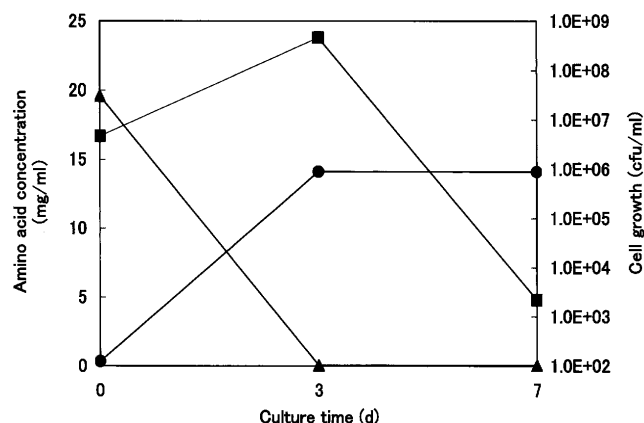


Fig. 6. Production of GABA from rice bran using 30 l jar fermentor. Rice bran medium cultivation temperature was 30°C and agitation speed 50 rpm. Symbols are the same as in Fig. 2.

圧搾機 MO-4 型（薮田産業製）を使用した。RB 培地を圧搾機に通液すると内圧が上昇し、連続的に液体採取が不可能であった。圧搾機用のろ布にデキストリンなどが吸着、目詰まりし、内圧上昇を起こしたことが原因と思われる。そこで、RB 培地に、市販の糖化酵素剤ピオザイム A（天野製薬）を米糠重量に対して 1/1000 添加し、55°C で 1 時間の糖化处理後、同様に圧搾機による固液分離を行った。

糖化处理によって、流動性が高まったことで目詰まりがなくなり連続ろ過が可能となり、液体収率が 65.6% (w/w) と遠心分離法 (3000 rpm, 50 分) 65.2% (w/w) と同等であった。得られた液体および固形分を含むろ過残渣の GABA 含有濃度は、それぞれ液体 1.3% (w/v) およびろ過残渣 1.2% (w/w) 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固体の生産が可能と判断され、食品副産物の米糠を用いて廃棄物を出すことなく GABA 生産が可能となった。

要 約

Lactobacillus brevis IFO12005 および米糠を用いて γ -アミノ酪酸 (GABA) の効率的な生産法を検討した。清酒製造の際に発生する米糠（あきたこまち、めんこいな、

秋田酒こまち）を唯一の栄養源とした米糠混合液（酵素未処理）を用いて、*L. brevis* IFO12005 を液体培養することにより米糠重量の 8% (w/w) を添加したグルタミン酸ナトリウム (MSG) から 90% 以上の変換率で GABA を生産することができた。しかし、米糠に対し 8% 以上の MSG を添加した場合、GABA への変換効率は低下した。さらに、複合酵素処理した米糠培地 (RB 培地) を用いることにより、米糠が液化され *L. brevis* IFO12005 の栄養源が倍増した。複合酵素処理した RB 培地は無処理の米糠混合液と比べ、培地の加水割合を 1:4 から 1:6 に増加させた上、さらに、MSG の添加量を 8% から 16% 増加させた場合、95% 以上の変換率でかつ高収量で GABA を 24 時間で生産した。30 l ジャー培養装置による RB 培地 20 kg スケールの培養により GABA が 1.4% (w/w) 生産された。培養液を固液分離によって 1.0% (w/w) 以上の GABA 含有組成物の液体、固体を製造することができた。

文 献

- 1) 浜田尚樹, 村北宏之: 島津評論, **45**, 183-187 (1988).
- 2) Stanton, H. C.: *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: 日食工誌, **47**, 596-603 (2000).
- 4) Saikusa, T., Horino, T., and Mori, Y.: *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1122-1125 (1994).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 岡田忠司: 食品と開発, **36**, 7-9 (2001).
- 8) 杉下朋子: 食品と開発, **36**, 10-11 (2001).
- 9) 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森正司, 岡本順子: 農化, **61**, 817-822 (1987).
- 10) 渡辺敏郎, 今城小百合, 井上美保, Mazumder, T. K., 永井史郎, 辻 啓介, 段 武夫: ヘモレオロジー学会誌, **7**, 39-43 (2004).
- 11) 愛宕世高, 戸田登志也, 奥平武則: 食品と開発, **36**, 12-14 (2001).
- 12) Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., and Oda, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1168-1171 (1997).
- 13) 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).