

氏名	侯 歌川
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第4785号
学位授与の日付	平成25年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	γ -アミノ酪酸高生産性乳酸菌を応用した機能性発酵食品の開発に関する研究
論文審査委員	教授 宮本 拓 教授 坂口 英 教授 近藤 康博

学位論文内容の要旨

γ -アミノ酪酸 (GABA) は自然界に広く分布しているアミノ酸であり、生体内では抑制性の神経伝達物質として血圧低下作用やストレス低減作用などの生理機能を持つことが知られている。本研究では世界の発酵乳等から分離された乳酸菌の中から高いGABA生産能力を持つ乳酸菌をスクリーニングし、GABA 生産活性に及ぼす要因について調べた。また、鶏肉発酵調味液及び米糖化液でのGABA 富化についても検討した。

まず、研究室保有の乳酸菌218 株を供試菌株として、1.0%グルタミン酸ナトリウム含有のグルコース-ラクトース-酵母エキス-ペプトン (GLYP) 液体培地を供試培地として用いた。各菌株の適温で72 時間培養し、加熱滅菌後、3,000rpm15 分間で遠心分離し、上清液のGABA 含量をTLC 法及びHPLC 法で測定した。分離源及びGABA生産量により、218 株の乳酸菌から3 株をスクリーニングし、同定した。次に、培地の初発pH、グルタミン酸ナトリウム濃度及び培養時間とGABA 生産活性の関係を検討した。選択した3 株については、鶏肉発酵調味液及び米糖化液への添加効果について調べた。

TLC 法及びHPLC 法によってGABA 含量を測定した結果、218 株のうち*Lactobacillus brevis* の1株 (1056株) と *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* の2 株 (DH1株及びKM株) において高いGABA 生産性が見られた。GABA 生産に及ぼす培養条件の影響を調べたところ、培地の初発pH は5.0 の時が最適であり、培養72 時間から96 時間がGABA 生産のピークになっていた。初発グルタミン酸ナトリウム濃度を1.0%、初発pHを5.0とし、培養96 時間でのGABA 生産量は*Lactobacillus brevis* 1056が6.34mg/ml であり、*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* のDH1株とKM株がそれぞれ5.60mg/mlと2.87mg/mlであった。また3 株とも2.0~10.0%の高濃度のグルタミン酸ナトリウム存在下でも生育した。しかし、*Lactobacillus brevis* が高いGABA 変換率を示す一方で、*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* のGABA 変換率は著しく低下した。

選択したGABA高生産性乳酸菌の鶏肉発酵調味液及び米糖化液への応用について検討した。まず、廃用成鶏を有効活用する目的で、食塩、グルコース及び蒸留水を添加したミンチ状の鶏肉をプロテアーゼ及びグルタミナーゼで処理して鶏肉発酵調味液を調製したところ、*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* は調味液中での生育が見られなかったが、*Lactobacillus brevis* 1056は調味液中でよく生育し、培養96 時間で1.51mg/ml のGABA を生産した。次に、廃棄物としての無洗米粉を発酵利用するために、米 (無洗米粉あるいは白米) 含有の10%溶液を使用し、 α -アミラーゼで澱粉を液化し、グルコアミラーゼでグルコースに糖化した米糖化液を発酵素材として用いた場合、*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* KMは他の菌株に比べ米糖化液中での生育に適し、かなり高いGABA生産活性を示した。無洗米粉の10%溶液を用いて調製した米糖化液に、1.0% カザミノ酸と1.0%グルタミン酸ナトリウムを添加して、KM株で120時間発酵すると、3.33 mg/mlのGABAを生産した。

以上のように、*Lactobacillus brevis* 1056、*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* DH1 及び *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* KM は高い GABA 生産活性を示し、鶏肉発酵調味液ならびに米糖化液での発酵利用に有効であることが示唆された。今後、乳を始めてする動植物起源の食品素材を利用し、GABA 富化した機能性飲料あるいは機能性食品素材の実用化が望まれる。

論文審査結果の要旨

γ -アミノ酪酸 (GABA) は自然界に広く分布しているアミノ酸であり、生体内では抑制性の神経伝達物質として血圧低下作用やストレス低減作用などの生理機能を持つことが知られている。本研究では世界の発酵乳等から分離された乳酸菌の中から GABA 生産能力を持つ乳酸菌をスクリーニングし、GABA 生産活性に及ぼす要因について調べた。また、鶏肉発酵調味液及び米糖化液での GABA 富化についても検討した。

研究室保有の 218 株の乳酸菌を 1.0% グルタミン酸ナトリウムを含むグルコース-ラクトース-酵母エキス-ペプトン (GLYP) 液体培地にそれぞれ 1% 量を接種し、適温で 72 時間培養した。加熱滅菌後、培養上清中の GABA 含量を TLC 法で判定量的に測定することで、高い GABA 生産活性を持つ乳酸菌 18 株をスクリーニングした。また HPLC 法を用いて、TLC 法で選択した 18 株から 3 株を最終的にスクリーニングした。選択した 3 株の GABA 高生産性乳酸菌について、生理・生化学的性状試験及び 16SrDNA の部分塩基配列の相同性検索を実施したところ、それらはヘテロ発酵型中温性乳酸桿菌 1 株とホモ発酵型中温性乳酸菌 2 株であり、それぞれ *Lactobacillus brevis* 1056, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DH1 及び *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KM と同定した。

選択した 3 株乳酸菌の GABA 生産に及ぼす培養条件の影響を調べたところ、培地の初発 pH は 5.0 の時が最適であり、培養 72 時間から 96 時間で GABA 生産のピークになっていた。初発グルタミン酸ナトリウム濃度を 1.0%、初発 pH を 5.0 とし、培養 96 時間での GABA 生産量は *Lactobacillus brevis* 1056 が 6.34mg/ml であり、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の DH1 株と KM 株がそれぞれ 5.60mg/ml であった。また 3 株とも 2.0~10.0% の高濃度のグルタミン酸ナトリウム存在下でも生育した。しかし、*Lactobacillus brevis* が高い GABA 変換率を示す一方で、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の GABA 変換率は著しく低下した。

GABA 高生産性乳酸菌の鶏肉発酵調味液及び米糖化液への応用について検討した。まず、廃用成鶏を有効活用する目的で、食塩、グルコース及び蒸留水を添加したミンチ状の鶏肉をプロテアーゼ及びグルタミナーゼで処理して鶏肉発酵調味液を調製したところ、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* は調味液中での生育が見られなかったが、*Lactobacillus brevis* 1056 は調味液中でよく生育し、培養 96 時間で 1.51mg/ml の GABA を生産した。次に、廃棄物としての無洗米粉を発酵利用するために、米 (無洗米粉あるいは白米) 含有の 10% 溶液を使用し、 α -アミラーゼで澱粉を液化し、グルコアミラーゼでグルコースに糖化した米糖化液を発酵素材として用いた場合、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KM は他の菌株に比べ米糖化液中での生育に適し、かなり高い GABA 生産活性を示した。無洗米粉の 10% 溶液を用いて調製した米糖化液に、1.0% カザミノ酸と 1.0% グルタミン酸ナトリウムを添加して、KM 株で 120 時間発酵すると、3.33mg/ml の GABA を生産した。

以上のように、*Lactobacillus brevis* 1056, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DH1 及び *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KM は高い GABA 生産活性を示し、鶏肉発酵調味液ならびに米糖化液での発酵利用に有効であることが示唆された。今後、乳を始めてする動植物起源の食品素材を利用し、GABA 富化した機能性飲料あるいは機能性食品素材の実用化が望まれるものであり、博士 (農学) の学位に値するものと判定する。