

博士論文

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

2013年3月

侯 歌川

岡山大学大学院

自然科学研究科

目 次

第1章 緒論	3
第2章 γ -アミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌のスクリーニングと同定	
緒言	12
材料及び方法	13
1. 供試乳酸菌	13
2. 供試培地	13
3. GABA 生産性の測定法	14
4. 乳酸菌の同定法	16
結果及び考察	20
1. GABA 高生産性乳酸菌のスクリーニング	20
2. スクリーニングした乳酸菌の同定	21
要約	25
第3章 γ -アミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌の GABA 生産活性に及ぼす培養条件の影響	
緒言	27
材料及び方法	28
1. 供試乳酸菌	28
2. 供試培地	28
3. GABA 生産性の測定法	29
4. 乳酸菌 GABA 生産活性に及ぼす影響要因の検討法	30
結果及び考察	32

1. GABA 生産活性に及ぼす培地 pH の影響	32
2. GABA 生産活性に及ぼすグルタミン酸ナトリウム濃度の影響	33
3. GABA 生産活性に及ぼす培養時間の影響	34
要約	35
第4章 γ -アミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌を応用した機能性発酵食品の開発	
緒言	37
1. 供試材料	39
2. 供試培地	41
3. 鶏肉調味液における乳酸発酵の方法	42
4. 米糖化液における乳酸発酵の方法	42
結果及び考察	43
1. GABA 高生産性乳酸菌の鶏肉発酵調味液への応用	43
2. GABA 高生産性乳酸菌の米糖化液への応用	44
要約	49
第5章 総括	50
謝辞	54
参考文献	55

第 1 章

緒 論

緒 論

乳酸菌は、糖を分解して多量の乳酸を生産する細菌の総称である。これは慣用的な呼び名であって、分類学上は、炭水化物を含有する有機培養基によく繁殖し、発酵生産物として消費したグルコースに対して 50%以上に相当する乳酸を生成する細菌を指す¹⁾。他には、グラム染色が陽性で、運動性がなく、胞子を作らず、グルコースを利用してホモ発酵（乳酸のみを生成する）あるいはヘテロ発酵（乳酸のほかに二酸化炭素やエタノール、酢酸を生成する）を行うことが条件に挙げられている²⁾。乳酸菌という名称は総称であり、その中には多種多様な性質を持つものが含まれる。1984年頃までに Orla-Jensen らが作成した分類体系をもとに、乳酸菌のグルコース発酵形式及び生成乳酸の旋光性（D 乳酸，L 乳酸または DL 乳酸）などの特徴を加え、*Lactobacillus* 属，*Streptococcus* 属，*Leuconostoc* 属と *Pediococcus* 属に分類された³⁾。その後さらに研究が続けられ、1986年に Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2)⁴⁾及び 1996年に The Genera of Lactic Acid Bacteria⁵⁾などが出版されてきて、乳酸菌の分類体系は細分化されるようになり、DNA の GC%含量，16SrDNA の塩基配列に基づく相同性解析等が行われるようになってきた。

現在、乳酸菌として位置つけられる属は *Lactobacillus* 属，*Lactococcus* 属，*Streptococcus* 属，*Pediococcus* 属，*Leuconostoc* 属，*Melissococcus* 属，*Enterococcus* 属，*Carnobacterium* 属，*Vagococcus* 属，*Tetragenococcus* 属，*Atopobium* 属，*Weissella* 属，*Lactosphaera* 属，*Oenococcus* 属，*Abiotrophia* 属，*Paralactobacillus* 属，*Granulicatella* 属，*Atopobacter* 属，*Alkalibacterium* 属，*Olsenella* 属など 30 以上の属に分類されている⁶⁾。表 1-1 に、乳酸菌の定義を示す。

表 1-1 乳酸菌 (Lactic acid bacteria) の定義

i グラム染色	: 陽性
ii 細胞形態	: 桿菌または球菌
iii カタラーゼ	: 陰性
iv 酸素要求性	: 無, または極微量要求 (通性嫌気性)
v 運動性	: 無
vi 内生孢子	: 無
vii グルコースの代謝	: 50%以上乳酸に変換する
viii 栄養	: 従属栄養

乳酸菌は自然界に広く分布しており, 古来から人間の生活に深く影響してきた。例えば動物に関連したものでは, ミルクや, 動物及び人の消化管系 (口腔内, ルーメン, 腸管内など), 膣内部, 動物糞などに乳酸菌が存在している。植物に関連したものでは, 花の蜜, 花芽などから分泌される甘い汁, 樹液, 植物体 (葉, 茎, 花, 果実, 根など) の堆積土, 傷付いた果実, 植物の損傷部などがあげられる⁷⁾。

一方, 発酵食品 (ヨーグルト, チーズ, 漬物, 調味料など) においても乳酸菌は重要な役割を果たしている。発酵食品, 特に発酵乳の歴史は極めて古い。人間は昔から, 乳をはじめ多くの種類の食品の保存や調味に乳酸発酵を巧妙に利用してきた。旧約聖書創世紀にはすでに発酵乳が記載されている。世界にはいろいろな発酵乳があり, ヨーグルト, チーズ, ダヒ, レーベン, クミスなどはいずれも何千年に及ぶ歴史を持つ発酵乳製品である⁸⁾。現在では, 乳酸菌は発酵乳, 発酵肉製品, 醸造製品, 発酵豆乳, 漬物などの野菜, 果実の加工品, パン類など多くの食品の加工に利用されるだけでなく, 飼料の保存, ワインの生産, 工業用乳酸の製造, 環境問題の解決などの分野にも貢献している⁹⁾。さらに, 近年の研究

において、乳酸菌が生産する有用物質または乳酸菌自身を利用し、人体の生理的機能などに有益な影響を与える機能性食品の開発を目的とする研究が盛んに行われている。

食品の持つ機能は一次機能（栄養特性）、二次機能（嗜好特性）及び三次機能（生体調節機能）に分類されている。特に、栄養不足から栄養過剰へと転換した時代背景のもとに増え続ける生活習慣病の予防対策として食品の三次機能に対する期待が高まってきた。具体的には、ヒトの免疫系、内分泌系や神経系などを調節することによる病気予防や健康維持機能、アレルギーの軽減による生体防御機能、高血圧や糖尿病、ガンなどの疾病を防止し回復させる機能、消化器系や神経系を調節する生体リズムの調整機能、抗酸化作用など老化を抑制する機能などのことを指す¹⁰⁾。このような機能を持つ食品への需要が年々高まっている。

1984年に食品の三次機能と呼ばれる「生体調節面の働き」に注目した当時の文部省研究班が「機能性食品」の概念を基にして立上げられ、その定義は「生体の調節によって生活習慣病のリスクを軽減し、その発症を遅らせることによって健康寿命を延ばすことに役立つ補助食品」とされているが、乳酸菌のヒトへの効果を念頭においた乳酸菌飲料や乳製品はこの範疇に含まれるものとして注目された¹¹⁾。乳酸菌や、発酵乳を中心とした発酵食品についても、ヒトや動物への様々な効果についての研究が行われてきた。発酵乳や乳酸菌の摂取による栄養成分の吸収の改善効果、便性改善効果と腸内フローラの改善^{12, 13)}、血清コレステロールの低減作用^{14~17)}、抗腫瘍作用^{18, 19)}、抗変異原作用^{20~22)}、血圧降下作用及び動脈硬化予防効果^{23~27)}、及び免疫防御系の改善効果と免疫細胞の賦活化作用^{28, 29)}などが実証されつつある。

乳酸菌の持つ栄養生理機能のうち、注目されているものの一つに、 γ -アミノ酪酸(GABA)生産性があげられる。GABAは甲殻類の神経接合部、哺乳類の脳、脊髄などに多く存在している非蛋白性のアミノ酸であり、正式な学名は γ -アミノ酪酸または4-アミノ酪酸である。GABAは、中枢神経系において抑制性神経伝達物質として作用すると考えられ、脳に非常に重要な物質であると言える^{30, 31)}。主な生理機能としては、血圧降下と利尿作用、ストレス低減、脂質代謝の促進、肝臓や腎臓の働きを高め、睡眠障害の改善、及び神経を鎮めるなどの効果が知られている。GABAを多く含む食品には玄米、大豆、カボチャ、キノコ、トマトなどがある。GABAはグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)という酵素でグルタミン酸から生合成されるが、乳酸菌の発酵によっても生産され、多くの発酵食品、例えば漬物³²⁾、キムチ^{33, 34)}、発酵乳製品^{34~36)}などの中から、GABAを生成する乳酸菌が発見されている。

乳酸菌におけるGABA産生系の存在意義は、解糖系で生成したプロトン进行处理する一つの機構ではないかと推定されている。GABAを産生する乳酸菌 *Lactococcus. lactis* を用いて調製した発酵乳は、ヒトにおいて穏やかな血圧降下作用を示すことが報告されている³⁷⁾。GABAの生理機能が証明されて以来、乳酸菌を利用してGABAを生産することや、GABAを添加した機能性食品などの研究がされている。図1-1は、グルタミン酸からGABAの生成を示す。

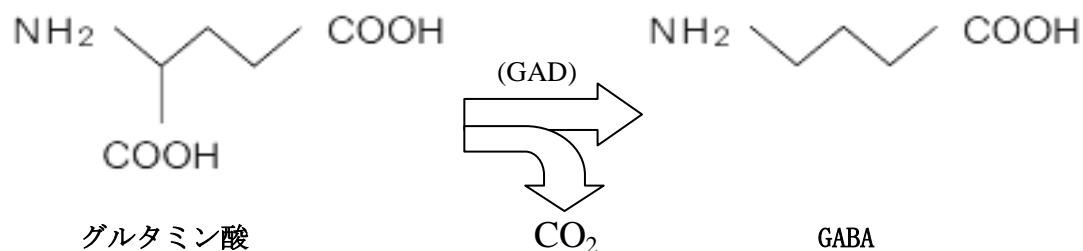


図 1-1 グルタミン酸から GABA の生成

現在、アジア、特に日本においては、乳酸菌を利用する発酵食品として、発酵乳などの乳製品が主流であり、ソーセージ、ハムなどの食肉製品、及び野菜、果実、米などの植物製品への乳酸発酵に関する研究は相対的に少ない。欧米では古くから発酵食肉製品がごく一般的な食品として親しまれてきたが、日本ではまだあまり認知されていない³⁸⁾。だが日本でよく見られるサラミも、もともとは乳酸菌を利用した発酵食肉製品であり、発酵により嗜好性を高めると共に食肉の保存性も向上させてきた。また、食肉の発酵過程に生産される成分は、風味に関するものだけではなく生体調節機能に関するものであり、近年ではその成分や機能を検討することで付加価値の高い発酵食肉製品を開発する研究が行われている。

食肉は豊富なタンパク質や優れたアミノ酸組成を持ち、鉄や亜鉛などのミネラルやビタミン類を含み、生体調節機能のある多数の成分を有する。タンパク質を酵素処理して得られるペプチドには血圧上昇抑制作用や抗酸化作用、ミネラル吸収作用などの機能を持つものなどがあることも知られている^{39, 40)}。しかし、食肉の持つこれらの機能性を利用した発酵食肉製品の分野が研究され初めてまだ日は浅い。特に、鶏肉を原料として発酵食肉製品を作る方法はほとんど見られない。鶏肉は食肉の一種であり、牛肉、豚肉と並び主要食肉の一つとなっている。日本における鶏肉の需給量は1999年で約175万トン、全食肉の32%を占める⁴¹⁾。鶏肉の脂肪には飽和脂肪酸が少なく、動脈硬化や心臓病に予防効果のある不飽和脂肪酸が多く、牛肉や豚肉と魚肉の中間的な脂肪酸組成を示している⁴²⁾。鶏肉が以上のような特性があるため、今後この分野から画期的な機能性食品が製造される可能性は大きいと考えられる。

さて、 稲由来の米は、小麦、トウモロコシと共に、世界の三大穀物とされ、

日本人の主食である。稲とは、被子植物門，単子葉植物綱，稲目稲科のことで、他の農作物と同様に野生の植物を人間が改良栽培したものである。人類が米を食用にした歴史は非常に長い。遺跡から発見した古代米の放射性炭素による年代測定によって、今知られている最も古い例は中国浙江省河姆渡遺跡の B. C4, 770 ± 140 年と羅家角の B. C4, 955 ± 155 年である。また、タイ西北部の Sprit Cave と東北部の Non Nok Tha 遺跡なども古い遺跡(B. C1, 100–5, 500)で、稲作文化の存在を示唆するものである⁴³⁾。日本の栽培稲はいつ頃、どこからどのように伝わったかについてはまだ明らかにされていないが、縄文時代の晩期頃、少なくとも B. C2, 300 年以前に伝わったのだろうと言われており、数千年前には日本に伝わった可能性がある。

稲が日本に伝来して以来、米の加工方法及び技術が発展してきた。稲を粳摺りして、加工して精米になり、伝統的な米菓、味噌用などに用いられるが、一方で消費が伸びているのは調理用加工米飯用の米であり、冷凍食品、レトルト食品、無菌化包装食品、無洗米なども作られる。そのうち、無洗米は加工米の一種類であり、洗わないで炊飯できる米である。研ぐ手間が省けるだけでなく、糠の付着がなく酸化が遅いので水分が同じであれば保存性が良く、炊き上がりが均一で、研ぎ汁が出ないため環境汚染が回避できる。外食産業では人手や水道代が節約できるので経済的にも優れており、各方面から有利な特徴が指摘されている。無洗米の調製方法としては、古くは精米の製造過程でブラシにより糠を取る方法や気流で糠を吹き飛ばす方法があり、最近では脂質で糠を取るライスワックスコーティング法、または少量の水で短時間洗米する方法などが開発されている⁴⁴⁾。

米及び米関連品の加工方法は古くより行われおり、米粉を利用した菓子の生産、

碎米，くず米，下級米を穀粉，味噌あるいはライス麺，菓子類への利用⁴⁵⁾，及び米を酵母で発酵して清酒，焼酎，米酢，みりん，ビールなどの製造が知られているが，乳酸菌を用いて米を乳酸発酵する研究は少ない。

本研究は，GABA の生理機能に着目した機能性食品の開発を目標し，GABA 高生産性乳酸菌をスクリーニングし，鶏肉調味液及び無洗米を加工する過程に排出される無洗米粉で調製した米糖化液の有効活用について検討した。まず第 2 章では，GABA 高生産性乳酸菌をスクリーニングするため，世界各地の発酵乳製品などから分離した乳酸菌の GABA 生産性を調べ，GABA 高生産性乳酸菌を選択した。また，選択した GABA 高生産性乳酸菌を同定するために，乳酸菌の生理生化学的性状及び分子遺伝学的性質を調べた。第 3 章では，選抜した菌株の GABA 生産活性に及ぼす要因を解明するために，培地の初発 pH，培地の初発グルタミン酸ナトリウム濃度及び培養時間について調べ，GABA 生産に適した培養条件の検討を行った。また，第 4 章では，GABA 高生産性乳酸菌を応用した機能性食品を開発するために，鶏肉発酵調味液及び米糖化液への GABA 富化について検討した。

第2章

γ -アミノ酪酸(GABA)高生産性乳酸菌の スクリーニングと同定

緒 言

乳酸菌は自然界に広く分布しており、発酵乳やチーズなどに代表される数多くの伝統的な発酵食品に存在し、古来より人々の食生活に密接な関係を持つ微生物である。また、乳酸菌は、安全な微生物として食品の発酵に用いられ、保存性の向上や風味の形成に役立てられてきた。特に近年、乳酸菌の生産する代謝産物や乳酸菌自体を利用した機能性食品が開発されている。乳酸菌の持つ様々な生理機能のうち、注目されているものの1つとして、 γ -アミノ酪酸(GABA)生産活性があげられる。 γ -アミノ酪酸(GABA)は、微生物から植物、動物に至るまで広く自然界に分布するタンパク質非構成アミノ酸であり、動物においては抑制性の神経伝達物質として知られている。GABAには、血圧低下作用、利尿作用及びストレス緩和作用などの生理効果が知られている。

本章では、GABA 高生産性乳酸菌を探索する目的で、世界各地の発酵乳製品等から分離した 218 株の乳酸菌を供試し、それらの GABA 生産性を薄層クロマトグラフィー法(TLC 法)及び高速液体クロマトグラフィー法(HPLC 法)によって検討した。スクリーニングした GABA 高生産性乳酸菌については、生理生化学的性状及び 16SrDNA の相同性解析によって同定した。

実験方法

1. 供試乳酸菌

世界各地の発酵乳製品等より分離した研究室保有の乳酸菌 218 株を供試菌株として使用した。

2. 供試培地

(1) GLYP 液体培地

グルコース	5.0g
ラクトース	5.0g
酵母エキス	10.0g
ポリペプトン	5.0g
酢酸ナトリウム三水和物	2.0g
硫酸マグネシウム七水和物	0.2g
硫酸マンガン四水和物	0.01g
硫酸鉄七水和物	0.01g
塩化ナトリウム	0.01g

以上の成分を 1,000ml の蒸留水に溶解し、pH を 6.8 に調整後、121°C15 分間高圧滅菌した。

(2) 冷凍保存用スキムミルク培地

スキムミルク	10g
L-グルタミン酸ナトリウム	0.10g

以上の成分を 100ml の蒸留水に溶解し、110°C20 分間高圧滅菌した。

(3) グルタミン酸ナトリウム含有の GLYP 液体培地

グルコース	5.0g
ラクトース	5.0g
酵母エキス	10.0g
ポリペプトン	5.0g
酢酸ナトリウム三水和物	2.0g
硫酸マグネシウム七水和物	0.2g
硫酸マンガン四水和物	0.01g
硫酸鉄七水和物	0.01g
塩化ナトリウム	0.01g
グルタミン酸ナトリウム	10.0g

以上の成分を 1,000ml の蒸留水に溶解し、pH を 6.8 に調整後、121°C15 分間高圧滅菌した。

3. GABA 生産性の測定法

(1) 薄層クロマトグラフィー (TLC) 用の器具と試薬

(薄層プレート) シリカゲル 60F254 プレート (20 x 20cm) (Merck 製)

(展開溶媒) n-ブタノール : 酢酸 : 水 = 3 : 2 : 1

測定の前日に展開溶媒を展開槽に入れ、24 時間置いて飽和化させる。

(発色試薬) 0.7%ニンヒドリン溶液

(2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用の試薬

(移動相)

リン酸二水素ナトリウム 0.936g

リン酸	0.96ml
0.5M ヘキサンスルホン酸ナトリウム水溶液	20ml

以上の成分を蒸留水 1,000ml に十分に溶解し、pH を 2.5 に調整後、孔径 0.45 μ m フィルターでろ過し、脱気した。

(反応液)

炭酸ナトリウム	40.7g
硫酸カリウム	18.8g
ホウ酸	13.4g
N-アセチル-L-システイン	1g
オルソ(0)-フタルアルデヒド(OPA)	0.8g
エタノール	14ml

炭酸ナトリウム、硫酸カリウム及びホウ酸を蒸留水 1,000ml で十分に溶解し、986ml を測り取り、N-アセチル-L-システインを加えて溶解した。あらかじめエタノールで溶解した 0-フタルアルデヒド(OPA)を加え攪拌し、孔径 0.45 μ m フィルターでろ過し、脱気した。

(3) GABA 生産量の測定方法

スキムミルク培地に冷凍保存している供試菌株を、GLYP 液体培地で 3 回継代培養し、その 1%菌液を 1%グルタミン酸ナトリウム含有の GLYP 液体培地 (pH6.8) に接種し、適温で 72 時間培養した。その後 121°C15 分間の熱処理によって菌体を死滅させ、3,000r. p. m. で 15 分間遠心分離した。上清を TLC 法及び HPLC 法による GABA 測定のための試料とした。

TLC 法の測定は、TLC ガラス薄層プレート(シリカゲル 60F254 プレート, Merck)

の一端から 2cm のところに鉛筆で線を引き、線上に測定用試料をスポットする位置をつけ、試料を 2 μ l ずつスポットし、乾燥させた。展開槽に試料をスポットしたプレートを入れ、展開距離が 10cm から 15cm 程度になったらプレートを取り出し、十分乾燥させた。展開溶媒が完全に蒸発したのを確認したのち、ドラフト内で発色試薬を噴霧し、乾熱オーブンで 100°C 10 分間加熱し、GABA を発色させた。発色した色の強さを発色強度とし、濃度既知の GABA 溶液をスポットした発色プレートを指標とし、GABA 生産量の目安を 5 段階に分類した。発色の見られないものは発色強度マイナス(−, 0.1 mg/ml 未満)とし、以下順にプラスマイナス(±, 0.1-0.5 mg/ml), プラス 1(+, 0.5-2.0 mg/ml), プラス 2(++ , 2.0-4.0 mg/ml), 発色の最も強かったものを発色強度プラス 3(+++ , 4.0 mg/ml 以上)とした。

HPLC 法の測定は、Shim-pack VP-ODS カラム(150x4.6mm I.D., 島津製)を用い、カラム温度は 45°C とし、移動相の流速を 0.8 ml/min にした。GABA は OPA 法により誘導体化し、励起波長 350nm, 発光波長 450nm の蛍光で検出した。注入試料には、培養上清試料を蒸留水で 1,000 倍希釈し、孔径 0.20 μ m のフィルター(Millipore)でろ過したものをを用い、20 μ l ずつカラムに注入した。測定用試料の GABA 濃度は、GABA 濃度 5.20mg/L の GABA 溶液を指標として算出した。

4. 乳酸菌の同定法

(1) グラム染色と形態観察

24.7g の BCP 加プレートカウントアガール(日水製)を 1,000ml の蒸留水に溶解し、121°C 15 分間高压滅菌し、シャーレに分注した。供試菌株を GLYP 培地で継代培養後、BCP 加プレートカウントアガール平板に画線して、30°C で 24 時間培養した。出現したコロニーをグラム染色に用いた。グラム陽性菌はクリスタルバイオ

レットにより濃紫色に，グラム陰性菌はサフラニンにより赤色に染まる。染色後顕微鏡で形態を観察した。

(2) 生成乳酸の旋光性試験⁴⁶⁾

供試菌株を継代培養した菌液を液体培地に 1%接種して適温で 48 時間培養後，遠心分離によって得た培養液の上清 2ml，ジエチルエーテル 3ml 及び 2N 塩酸 1ml を混合した。しばらく静置した後，上層のジエチルエーテル層 2ml を採取し，45°C のウォーターバスでジエチルエーテルを蒸発させた。これに蒸留水 1ml 添加し攪拌後，孔径 0.20 μ m のフィルターを用いて濾過し，HPLC 分析に用いた。カラムは SUMICHIRAL OA-5000 (住化分析センター製) を用いた。

(3) 温度生育性試験

0.006% のブロムクレゾールパープル (BCP) を含有した液体培地を使用して行った。供試菌株を継代培養した菌液を 0.85% の滅菌生理食塩水で 10 倍希釈後，BCP を含む液体培地に 1%接種し，10°C，15°C 及び 45°C でそれぞれ培養し，10 日間まで観察し，BCP の色が黄変したものを陽性とした。

(4) ホモ・ヘテロ発酵型の識別試験

A 培地 (180ml あたり：スキムミルク 20.0g，酵母エキス 0.75g，グルコース 0.90g，リトマス液適量，加温溶解)，B 培地 (50ml あたり：ペプトン 0.50g，塩化ナトリウム 0.25g，寒天 0.75g，加温溶解) 及び C 培地 (2.5ml あたり：硫酸マンガン 0.01g，加温溶解) を混合後，試験管に 10ml ずつ分注し，110°C 20 分間高压滅菌した。滅菌後温度を 50°C 程度に保ったまま，供試菌株を 1% 量接種し，静かに混合したのち，固化させた。その上に D 培地 (50ml あたり：寒天 0.50g，加温溶解，121°C 15 分間高压滅菌，50°C 保存) を 1.5-2.0cm の高さまで静かに注ぎ固化

させ、適温で培養した。ヘテロ発酵型の乳酸菌はガスを生産するため、D 培地の栓を押し上げるが、ホモ発酵型の乳酸菌にはこの現象が見られない。

(5) L-アルギニン塩酸塩からアンモニアの生成試験

液体培地に 0.3-0.5%の L-アルギニン塩酸塩を溶解し、孔径 0.20 μ m の滅菌用フィルターでろ過し、乾熱滅菌した試験管に 5ml ずつ分注した。そこに供試菌株を継代培養した菌液を 1%接種し、適温で 10 日間培養した。培養後、培養液 4ml に対し、ネスラー試薬液を 1ml 加え 30 分から 1 時間観察して、黄色または赤褐色の沈殿が生じたものを陽性とした。

(6) 運動性試験

Soft agar 法を用いて運動性を調べた。まずグルコース、酵母エキス、ペプトン、肉エキス各 0.5g 及び Tween 80 0.05g、寒天 0.15g を 100ml の蒸留水と混合して溶解し、試験管に 5ml ずつ分注して、121°C15 分間滅菌し、運動性試験培地として使用した。供試菌株の十分生育した継代培養液を用いて白金線で試験培地に穿刺する。供試菌株の至適温度で 48-72 時間培養し、毎日肉眼観察する。穿刺ラインに沿って生育している場合は運動性なし(-)、穿刺ラインから外に向かって雲がかかったように拡散して生育している場合は運動性あり(+)と判定する。

(7) カタラーゼ試験

供試菌株を 5ml の培地で 48 時間培養し、3,000 r.p.m で 10 分間の遠心分離によって集菌する。遠心分離後上清液を除き、菌体の上に 3%の過酸化水素溶液 1ml を注入し、2-3 分間観察する。発泡のない場合がカタラーゼ陰性である。発泡が見られたら、発泡している反応液の中へ 100 ppm アジ化ナトリウム水溶液 1ml を注ぐ、5-10 分間観察する。発泡が止まった場合にカタラーゼ陽性で、発泡が続

く場合にシュードカタラーゼ陽性である。

(8) アピシステムによる各種糖類発酵性試験

シスメック・バイオメリュー(株)の研究用炭水化物基礎プレートキットである API50CH を用いて、各種糖類の発酵性試験を行った。まず培地の成分からグルコース、ラクトースを除いた無糖培地に 0.006%の BCP を溶解し、pH を 6.8-7.0 に調整後、試験管に 4.5ml ずつ分注し 121°C15 分間高圧滅菌した。一方、供試菌株を継代した菌液 5ml は、3000r. p. m で 15 分間遠心分離して上清を除去し、0.85%の滅菌生理食塩水を 5ml 加え混合した。それを前述の無糖培地に 0.5ml 接種し、接種菌液をプレートのチューブに 75 μ l ぐらいずつ注入する。すべてのチューブに菌液を注入したら、トレイに約 10ml の滅菌水を入れ、その上に 5 枚のプレートを並べた。トレイのカバーをして、適温で 24 から 48 時間培養し、チューブの色をコントロールと比べ、黄色を陽性と判定し、その結果をアピ Web を用いて同定した。

(9) 16SrDNA 塩基配列の解析⁴⁷⁾

16S rDNA の部分塩基配列は、27f (5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と 518r (5' -ATTACCGCGGCTGCTGG-3') のプライマーを用いて Arakawa *et al.* (2008) の方法に従って決定し、DDBJ にて BLAST 法を用いて相同性検索を行った。

結果と考察

1. GABA 高生産性乳酸菌のスクリーニング

(1) TLC 法による供試菌株の GABA 生産性

表 2-1 は TLC 法で測定した供試菌株の GABA 生産強度を示す。

TLC 法では、供試した乳酸菌 218 株のうち、82 株において、0.1 mg/ml 以上の GABA 生産活性が確認された。発色強度プラス 3(++) の最も強い GABA 生産活性が検出された菌株は 1 株であった。次に、発色強度プラス 2(++), プラス 1(+) 及びプラスマイナス(±)の GABA 生産活性を有する菌株は、それぞれ 6, 11, 及び 64 株であった。一方、GABA を生産しない、もしくは 0.1mg/ml 未満しか生産しない発色強度マイナス(-)の菌株は 136 菌株であった。

表 2-1 TLC 法で測定した供試菌株の GABA 生産強度

GABA 量目安	強度	菌株数
4.0mg/ml 以上	+++	1
2.0mg/ml 以上 4.0mg/ml 未満	++	6
0.5mg/ml 以上 2.0mg/ml 未満	+	11
0.1mg/ml 以上 0.5mg/ml 未満	±	64
なし	-	136

(2) HPLC 法による供試菌株の GABA 生産性

TLC 法で GABA 生産強度プラス 1(+)以上を示した 18 菌株における培養上清中の GABA 含量を HPLC 法で測定した。図 2-1 は HPLC 法で測定した 18 菌株の GABA 生産量及び各菌株の培地 pH を示す。棒グラフは GABA 生産量、点グラフは培地 pH である。最も高い GABA 生産活性を有するのは 1056 株で、6.95mg/ml であった。また、

TLC 法で、2.0-4.0mg/ml 及び 0.5-2.0mg/ml の GABA 生産を示した菌株はそれぞれ 6 及び 11 株であった。様々な異なる特性を持つ菌株を選択するため、この 18 株から GABA 生産活性及び分離源の異なる 3 菌株を選択し、以後の実験に使用した。選択した菌株は、モンゴルの酸凝固型チーズ(ホロート)を分離源とする 1056 株 (GABA 生産量 6.95mg/ml)、マレーシアの発酵乳ダディヒを分離源とする DH1 株 (GABA 生産量 2.64mg/ml)、及びケニアの発酵乳マジワララを分離源とする KM 株 (GABA 生産量 1.50mg/ml)であった。

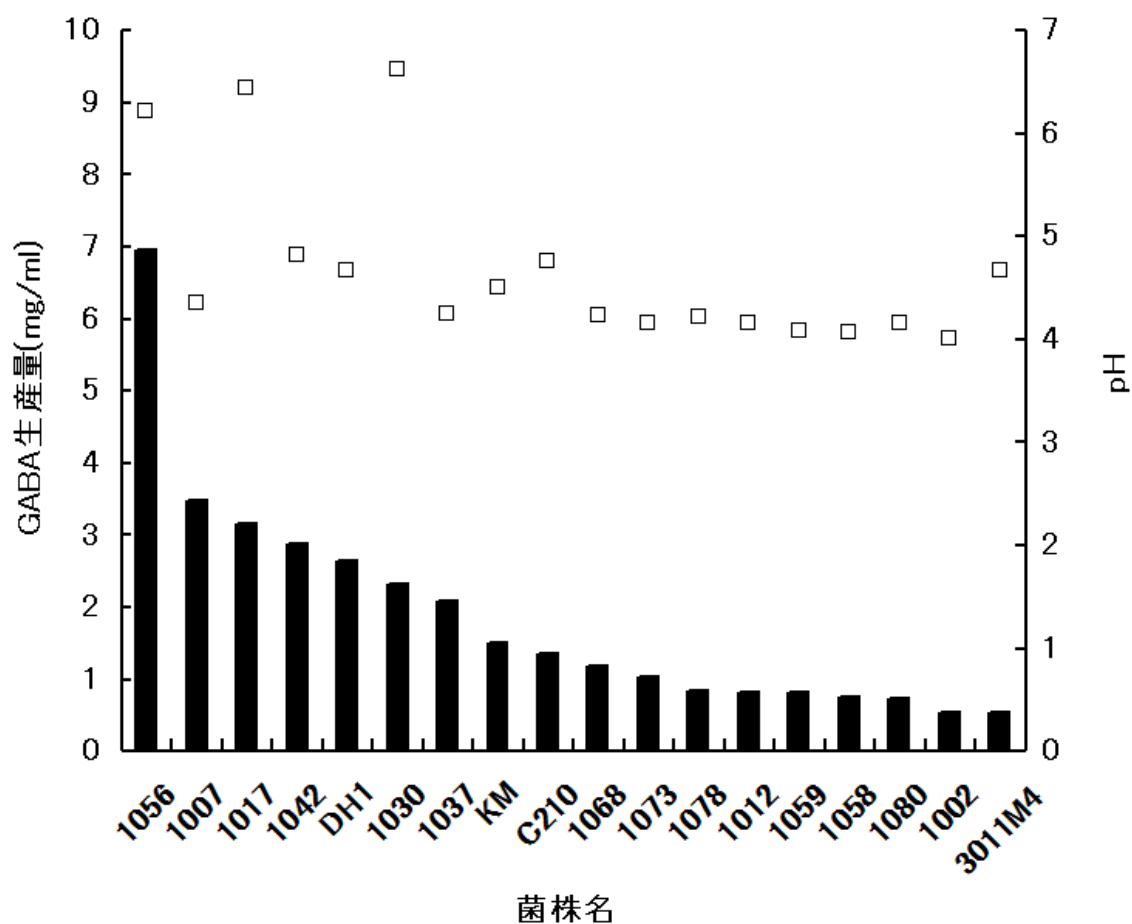


図 2-1 HPLC 法で測定した 18 菌株の GABA 生産量及び各菌株培地の pH

2. スクリーニングした乳酸菌の同定

(1) 乳酸菌の形態観察と生理生化学的性状

グラム染色による形態観察，生成乳酸の旋光性，温度生育性，ホモ/ヘテロ発酵型の識別，L-アルギニン塩酸塩からアンモニアの生成，運動性試験，カタラーゼ試験及びアピシステムによる各種糖類発酵性試験により，選択した3株の乳酸菌を同定した。表2-2に示すように，KM株及びDH1株はグラム陽性のホモ発酵型乳酸球菌であり，10℃及び15℃で生育したが45℃では生育しなかった。乳酸旋光性はL型であり，L-アルギニン塩酸塩からアンモニアを生成した。運動性はなく，カタラーゼ試験は陰性であった。1056株はグラム陽性のヘテロ発酵型乳酸桿菌であり，10℃及び15℃で生育したが45℃では生育しなかった。乳酸旋光性はL(D)型であり，L-アルギニン塩酸塩からのアンモニアを生成した。運動性はなく，カタラーゼ試験は陰性であった。アピシステム糖類発酵性を調べた結果，KM株及びDH1株は，*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*，1056は*Lactobacillus brevis*と同定した。表2-3は，アピWebで検索した結果を示す。

(2) 16SrDNAの部分塩基配列の解析に基づく相同性検索

3菌株の16S rDNAの部分配列を解析し，DDBJにてBLAST法を用いて相同性検索した。その後，アクセッション番号AB759536（KM株），AB759535（DH1株）およびAB759534（1056株）として登録した。

以上の形態的および生理生化学的性状並びに分子遺伝学性質の結果から総合的に判断し，KM株とDH1株を*Lc. lactis* subsp. *lactis*，1056株を*Lb. brevis*とそれぞれ同定した。いずれの菌株もGABA高生産性乳酸菌として広く知られる菌種であった⁴⁸⁾。

表 2-2 スクリーニングした乳酸菌の分類学的性状

菌株名	KM	DH1	1056
分離源	マジワララ (ケニア)	ダディヒ (マレーシア)	ホロード (モンゴル)
形態	球菌	球菌	桿菌
グラム染色	+	+	+
運動性	-	-	-
カタラーゼ	-	-	-
乳酸旋光性	L	L	L (D)
温度生育性			
	10°C	+	+
	15°C	+	+
	45°C	-	-
ホモ/ヘテロ発酵性	ホモ	ホモ	ヘテロ
アルギニンからのアンモニア生産	+	+	+
糖類発酵性			
Amygdalin	+	+	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	-
Esculin	+	+	-
D-Fructose	+	+	+
D-Galactose	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
Na-Gluconate	±	±	±
D-Lactose	+	+	+
D-Maltose	+	+	+
D-Mannitol	+	+	±
D-Mannose	+	+	-
D-Melezitose	-	-	-
D-Melibiose	-	-	±
L-Raffinose	±	-	-
L-Rhamnose	-	-	-
L-Ribose	+	+	+
Salicin	+	+	-
D-Sorbitol	±	±	-
Sucrose	+	+	-
Trehalose	+	+	-
D-Xylose	+	+	+
L-Xylose	-	-	-
Glycerol	-	-	-
Erythritol	-	-	-
Adonitol	-	-	-

Methyl- β -D-xylopyranoside	—	—	—
Methyl- α -D-mannopyranoside	—	—	—
Methyl- α -D-glucopyranoside	—	—	+
Sorbose	—	—	—
Dulcitol	—	—	—
Inositol	—	—	—
N-Acetyl glucosamine	+	+	+
Arbutin	+	+	—
Inulin	—	—	—
Starch	±	±	—
Glycogen	—	—	—
Xylitol	—	—	—
Gentiobiose	+	+	—
D-Turanose	—	—	—
D-Lyxose	—	±	—
D-Tagatose	—	—	—
D-Fucose	—	—	—
L-Fucose	—	—	—
D-Arabitol	—	—	—
L-Arabitol	—	—	—
2-Ketogluconate	—	—	—
5-Ketogluconate	—	—	±

表 2-3 同定結果

菌株名	KM	DH1	1056
菌種名	<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i>
%ID	85.8	85.8	96.7
T index	0.85	0.85	0.75

%ID:他の全ての分類群と比較した時の一致程度

T index:分類群で最も典型的なものと比較した時の一致程度

要 約

GABA 高生産性乳酸菌のスクリーニングを目的として、乳酸菌の GABA 生産性を検討した。1%のグルタミン酸ナトリウムを含有する GLYP 培地に乳酸菌液を 1%量接種して 72 時間培養し、その培養上清中の GABA 含量を TLC 法及び HPLC 法で検出することにより、研究室保有の 218 株乳酸菌の中から高い GABA 生産活性を持つ乳酸菌をスクリーニングした。

まず TLC 法で 18 株を選択し、HPLC 法を用いて 18 株から最終的に 3 株を選択した。選択した 3 菌株は、ケニアの発酵乳マジワラ由来の KM 株 (GABA 生産量 1.50mg/ml)、マレーシアの発酵乳ダディヒ由来の DH1 株 (GABA 生産量 2.64mg/ml)、及び中国内モンゴル自治区の酸凝固型チーズであるホロート由来の 1056 株であった。

また、生理・生化学的及び分子遺伝学的性質を調べることにより、この 3 株乳酸菌を同定した。API50CH データベースの解析結果及び 16SrDNA 塩基配列の解析結果により、DH1 株及び KM 株を *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* , 1056 株を *Lactobacillus. brevis* とそれぞれ同定した。いずれも GABA 高生産乳酸菌種として広く知られる菌種であった。

第3章

γ -アミノ酪酸(GABA)高生産性 乳酸菌のGABA生産活性に 及ぼす培養条件の影響

緒 言

乳酸菌が GABA を生産する目的の一つは、乳酸の生成によって低下した pH を上昇させるため、つまり pH の低下に対しての抵抗である⁴⁹⁾。そのため培地の初発 pH はある程度低い方が GABA の生産量は高くなるという結果が多く報告されている^{32, 33, 34, 50)}。一方、GABA の生産に関わる酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)の至適 pH は酸性側にあり、4.5-5.0 程度である^{36, 49)}。そのため、乳酸菌における GABA 産生系の存在意義は、解糖系で生成したプロトン进行处理する一つの機構ではないかと推定されている³⁷⁾。このような乳酸菌の特性を理解することが、多量の GABA を効率的に生産させるためには重要である。

一方、乳酸菌を用いて GABA を食品へ富化する際に検討しなければならないのが、発酵基質中の遊離グルタミン酸の量である。食品中に含まれるグルタミン酸の大部分はタンパク質やペプチドの構成アミノ酸として存在していることが多いが、乳酸菌に GABA を生産させるために培地となる食品に遊離のグルタミン酸がある程度以上含まれていなければならない。遊離グルタミン酸を増強する方法としては、グルタミン酸もしくはグルタミン酸を多量に含有する食品を発酵基質に添加する、あるいはタンパク質分解酵素もしくはタンパク質分解酵素を生産する乳酸菌を発酵基質に加えることによって、タンパク質を分解する方法が考えられる^{51~53)}。

本章では、GABA 生産に適した培養条件を検討するため、選抜菌株の GABA 生産性に及ぼす要因、つまり培地の初発 pH、培地の初発グルタミン酸ナトリウム濃度及び培養時間について検討した。

実験方法

1. 供試乳酸菌

中国内モンゴル自治区の酸凝固型チーズであるホロート由来の乳酸桿菌 *Lactobacillus brevis* 1056, マレーシアの発酵乳ダディヒ由来の乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DH1 及びケニアの発酵乳マジワララ由来の乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KM の 3 菌株を供試菌株として使用した。

2. 供試培地

(1) GLYP 液体培地

グルコース	5.0g
ラクトース	5.0g
酵母エキス	10.0g
ポリペプトン	5.0g
酢酸ナトリウム三水和物	2.0g
硫酸マグネシウム七水和物	0.2g
硫酸マンガン四水和物	0.01g
硫酸鉄七水和物	0.01g
塩化ナトリウム	0.01g

以上の成分を 1000ml の蒸留水に溶解し, pH を 6.8 に調整後, 121°C15 分間高圧滅菌した。

(2) 冷凍保存用スキムミルク培地

スキムミルク 10g

L-グルタミン酸ナトリウム 0.10g

以上の成分を 100ml の蒸留水に溶解し、110°C20 分間高圧滅菌した。

(3) グルタミン酸ナトリウム含有の GLYP 液体培地

グルコース 5.0g

ラクトース 5.0g

酵母エキス 10.0g

ポリペプトン 5.0g

酢酸ナトリウム三水和物 2.0g

硫酸マグネシウム七水和物 0.2g

硫酸マンガン四水和物 0.01g

硫酸鉄七水和物 0.01g

塩化ナトリウム 0.01g

グルタミン酸ナトリウム 10.0g

以上の成分を 1000ml の蒸留水に溶解し、pH を 6.8 に調整後、121°C15 分間高圧滅菌した。

3. GABA 生産性の測定方法

高速液体クロマトグラフィーの試薬

(1) 移動相

リン酸二水素ナトリウム 0.936g

リン酸 0.96ml

0.5M ヘキサンスルホン酸ナトリウム水溶液 20ml

以上の成分を蒸留水 1000ml に十分溶解し、pH を 2.5 に調整後、孔径 0.45 μ m フィルターでろ過し、脱気した。

(2) 反応液

炭酸ナトリウム 40.7g

硫酸カリウム 18.8g

ホウ酸 13.4g

N-アセチル-L-システイン 1g

オルソ(0)-フタルアルデヒド(OPA) 0.8g

エタノール 14ml

炭酸ナトリウム、硫酸カリウム及びホウ酸を蒸留水 1000ml で十分溶解し、986ml を測り取り、N-アセチル-L-システインを加えて溶解し、エタノールで溶解したオルソ(0)-フタルアルデヒド(OPA)を加え攪拌し、孔径 0.45 μ m フィルターでろ過し、脱気した。

4. 乳酸菌の GABA 生産活性に及ぼす影響要因の検討法

まず、1%グルタミン酸ナトリウム含有の GLYP 培地の初発 pH を 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 と変動させ、GLYP 液体培地で 3 回継代培養した供試菌株の菌液をグルタミン酸ナトリウム含有の GLYP 培地に 1%接種し、30°C で 72 時間培養させ、供試菌株の GABA 生産量を HPLC 法で測定した。次に GLYP 培地の初発 pH を 5.0, 培養時間を 72 時間とし、培地の初発グルタミン酸濃度を 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% と変動させた時の GABA 生産量を HPLC 法で測定した。最後に、1%グルタミン酸ナトリウム含有の GLYP 培地の初発 pH を 5.0 とし、培養時間を 0 か

ら 120 時間と変動させた時の供試菌株の GABA 生産量を 24 時間おきに HPLC 法で測定した。また、培養後の培地 pH も測定し、菌株の生育性及び GABA 生産の目安とした。HPLC による測定用試料の調製は、培養後の菌液を 121℃15 分間熱処理し、遠心分離した上清を蒸留水で 1000 倍希釈し、0.20 μ m のフィルターでろ過したものを HPLC 用試料として用いた。GABA 濃度 5.20mg/L の GABA 標準液を指標とし、試料の GABA 濃度を算出した。

結果と考察

1. 培地の初発 pH と GABA 生産活性の関係

選抜した 3 菌株の GABA 生産量及び培養後の培地 pH は図 3-1 に示す。棒グラフは GABA 生産量、折れ線グラフは培養後の培地 pH である。

KM 株及び DH1 株は、鶏肉発酵調味液の栄養成分が生育に適さないものと考えられ、pH4.0 以下の低い初発 pH 下では十分に生育せず、GABA 生産も確認されなかった。反対に、初発 pH が 5.0 から 8.0 にかけて高くなるにつれて、良好に生育はするものの、GABA 生産性は低下する傾向にあった。両株の GABA 生産活性は初発培地 pH5.0 の場合は最も高く、KM 株は 1.88mg/ml、DH1 株は 4.86mg/ml であった。培養後の培地 pH が初発 pH の値 (5.0-8.0) に関わらず 4.5-5.0 付近に収束したことと合わせて考えると、両菌株の GAD 至適 pH は 4.5-5.0 付近であると推察される。この値は乳酸菌における一般的な GAD 至適 pH と一致している。

一方、1056 株は、KM 株及び DH1 株と異なり、初発培地 pH4.0-8.0 で十分な生育及び高い GABA 生産が確認され、初発 pH が高くなるにつれて GABA 生産量も高くなった (初発 pH8.0 で 7.34mg/ml)。

以上より、選抜した 3 菌株の GABA 生産活性が高かった初発培地 pH については、KM 株及び DH1 株は 5.0 であり、1056 株は初発 pH が 5.0 から 8.0 の間で GABA 生産量が高くなった。

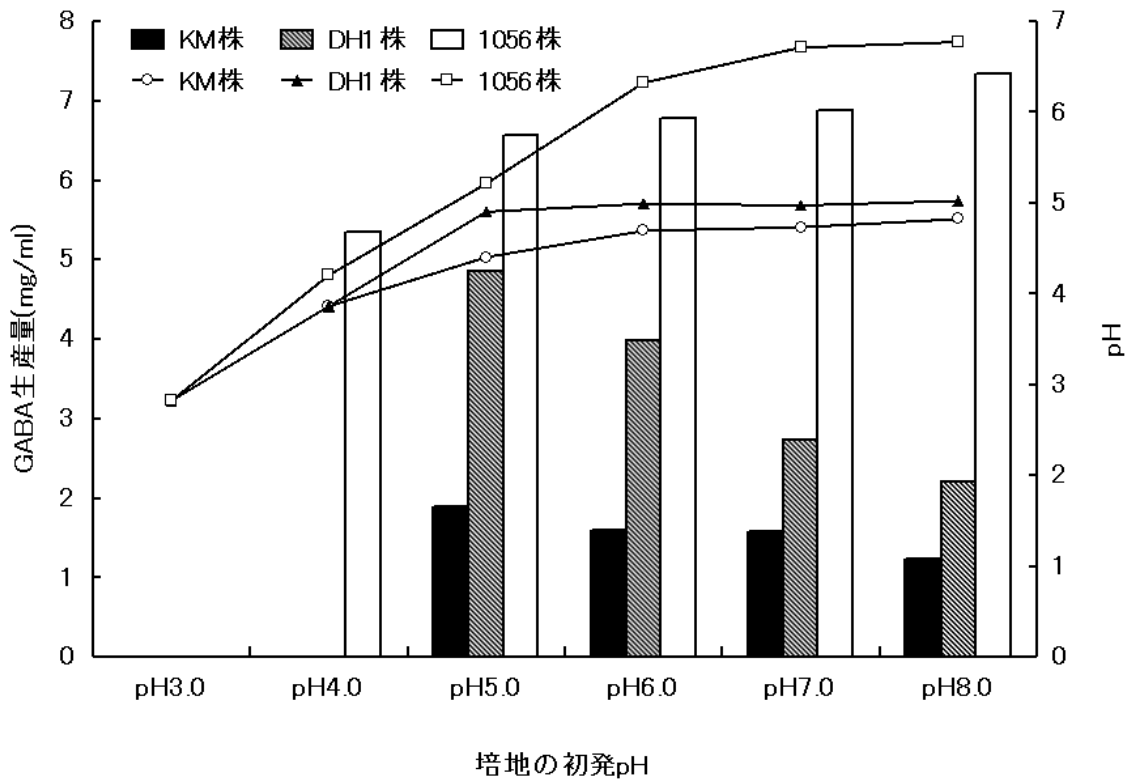


図3-1 培地の初発 pH を変動した時の測定用試料中の GABA 生産量及び培養後の pH (培地の初発グルタミン酸濃度 1%, 培養時間 72 時間)

2. 培地のグルタミン酸濃度と GABA 生産活性の関係

培養後の GABA 生産量及び培地 pH は図 3-2 に示す。棒グラフは GABA 生産量、折れ線グラフは pH である。図に示しているように、KM 株及び DH1 株は、グルタミン酸ナトリウム濃度と GABA 生産の間では、明らかな関係は見られなかった。また、両菌株では、10%グルタミン酸ナトリウムを培地に添加すると、菌の生育性が低下し、GABA 生産も減少することが明らかとなった。

一方で、1056 株では、添加したグルタミン酸ナトリウム濃度に依存して GABA 生産量の増加が確認され、10%グルタミン酸ナトリウムの添加で最大の GABA 生産 (46.32mg/ml) が検出された。また、培養後の培地 pH の上昇も大きく、添加グルタミン酸ナトリウム濃度が 10%で pH7.42 であった。

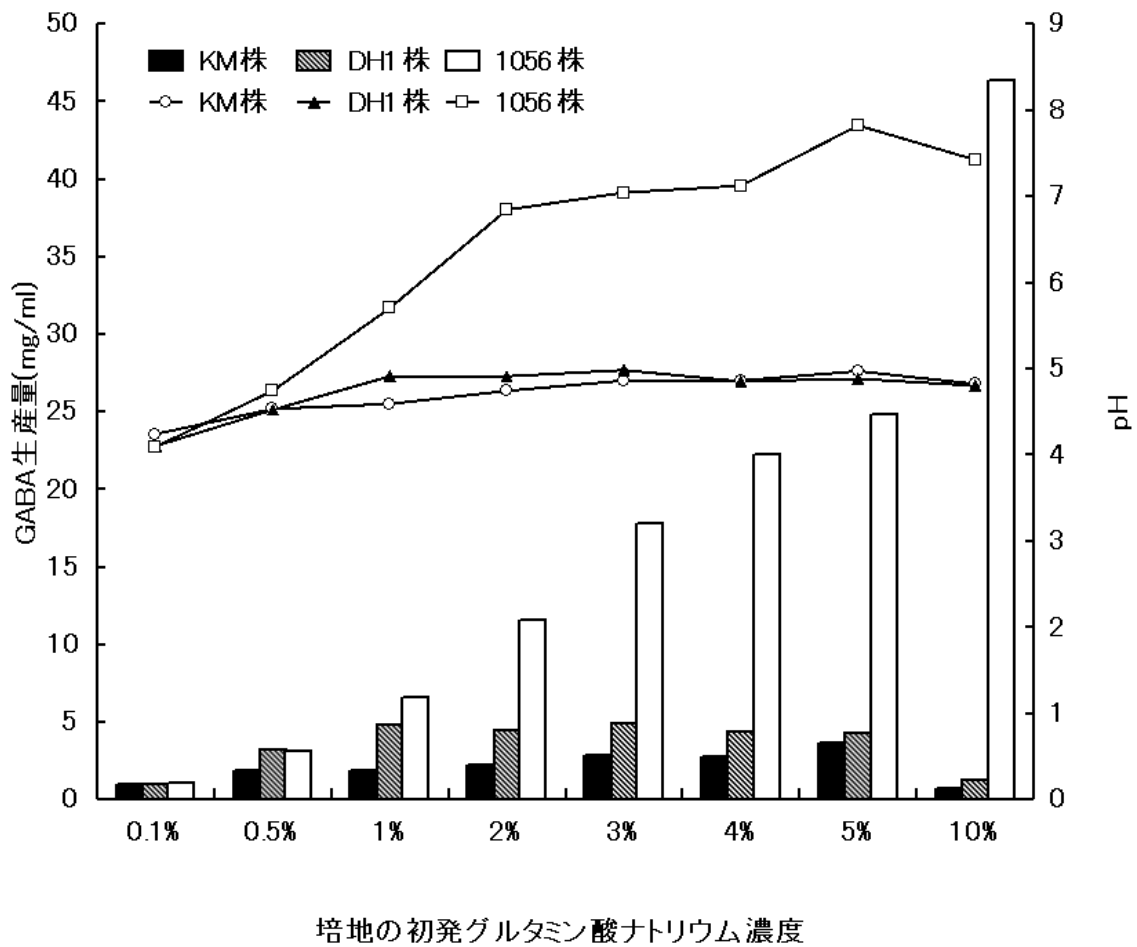


図 3-2 培地の初発グルタミン酸ナトリウム濃度を変動した時の測定用試料中の GABA 生産量及び培養後の培地 pH (培地の初発 pH5.0, 培養時間 72 時間)

3. 培養時間と GABA 生産活性の関係

培養後の GABA 生産量及び培地 pH は図 3-3 に示す。棒グラフは GABA 生産量, 折れ線グラフは pH である。

KM 株及び DH1 株では, 培養 24 時間後でそれぞれ 0.40 及び 2.31mg/ml と低い GABA 生産量であったが, その後の時間の経過と共に培養上清中の GABA 生産量が増加し, 96 時間後にはそれぞれ 2.87 及び 5.60mg/ml に達した。そして, 96 から 120 時間後にかけてはわずかな GABA 生産量の上昇のみ確認された (KM 株で 2.93mg/ml, DH1 株で 5.72mg/ml)。一方, 1056 株は, 培養 24 時間後ですでに 5.53mg/ml と十分な

GABA 生産を示し、その後 72 時間後に培養上清中の GABA 生産量のピーク (6.56mg/ml) を迎えるが、それほど大きな値の上昇は見られなかった。

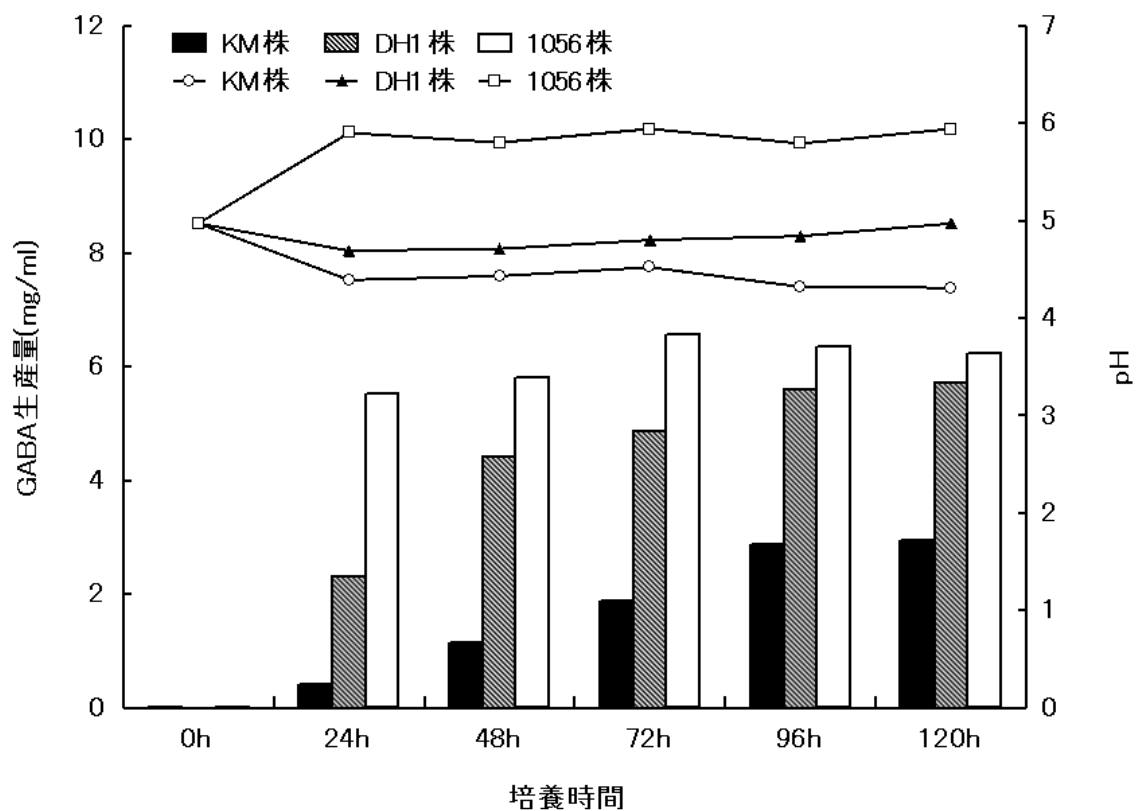


図 3-3 培養時間を変動した時の測定用試料中の GABA 生産量及び培養後の培地 pH (培地の初発 pH5.0, 培地の初発グルタミン酸ナトリウム濃度 1%)

要 約

GABA 生産性に及ぼす培地の初発 pH, 培地の初発グルタミン酸ナトリウム濃度及び培養時間について検討した。その結果により, KM 株及び DH1 株は, 初発 pH が 5.0 の場合, GABA 生産量が最も高く, pH が 6 以上になると GABA 生産量が減少した。1056 株は, 初発 pH が高くなるに連れて GABA 生産量が多くなる傾向が見られ, 初発 pH が 5.0 から 8.0 の間で GABA 生産量が高くなった。培地の pH を上昇させることも乳酸菌が GABA を生産する目的のひとつであるため, 初発 pH はある程度低い方が, GABA 生産を促進することができると考えられる。培養 72 時間から 96 時間が GABA 生産のピークであった。初発グルタミン酸ナトリウム濃度 1%, 初発 pH 5.0, 培養時間 96 時間での GABA 生産量は 1056 株が 6.34mg/ml, DH1 株が 5.60mg/ml, KM 株が 2.87mg/ml であった。3 株乳酸菌とも 2%から 10%の高濃度グルタミン酸ナトリウム存在下でも生育したが, *Lactobacillus brevis* 1056 は高濃度(10%)のグルタミン酸 Na 存在下でも高い GABA 生産活性を維持し, GABA への変換率は他の 2 株より高い結果であった。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KM 株と DH1 株は, 1056 株と比べグルタミン酸ナトリウム濃度と GABA 生産の間では明らかな関係は見られなかった。なお, 今回の実験条件では, いずれの場合でも 1056 株が最も高い GABA 生産活性を示した。

第4章

γ -アミノ酪酸(GABA)高生産性乳酸菌 を応用した機能性発酵食品の開発

緒 言

近年、乳酸菌の生産する代謝産物または乳酸菌自体を利用する機能性発酵食品の開発が活発に行われている。2012年11月5日までに、日本の特定保健用食品の表示を許可されてる食品は1024商品であり、そのうち乳酸菌が関与している健康効果商品が104品目で、使用された菌株は18株である⁵⁴⁾。乳酸菌の有する機能性についての検討及びそれらを利用した食品の創製に向けた研究が盛んに行われている。

一方で、岡山県の採卵鶏の飼養羽数800万羽であり、毎年の鶏卵生産量は10万5千トンであるが、そのうち廃用成鶏は約600万羽に相当する。廃鶏を有効活用し、新たな特産品を開発するために、鶏肉を主原料とし、伝統的な発酵技術を活用した新たな調味料、特に乳酸菌を利用した機能性発酵調味料の開発が望まれる。

また、我が国の加工米の一種である無洗米に対する需要が高まっている。無洗米は、精米の製造過程でブラシによりヌカを取ったり、気流でヌカを吹き飛ばしたり、また少量の水で短時間洗米するなど様々な方法によって製造されている。無洗米の加工過程に出てくる廃水と共に、もともと米表面に付着していた脂質、澱粉、ヌカなどが排出される。正式な名称はないけれども、一般的にはこうした粉末物を「無洗米粉」と呼ぶ。この無洗米加工過程で廃棄物として出る「無洗米粉」の利用方法は、長い間飼料加工用のみに用いられてきた。しかし、加工中の資源を有効利用し、廃棄物による環境汚染を避けるために、無洗米粉を工業原料あるいは食品として利用する新しい加工方法の開発研究が取り組まれている。

本章では、乳酸菌のGABA生産性を応用し、新たな機能性食品を開発するために、

選択した GABA 高生産性乳酸菌を鶏肉調味液及び米糖化液の発酵に応用した。

実験方法

1. 供試材料

(1) 鶏肉調味液の製造法

鶏肉発酵調味液の製造方法は図 4-1 に示す。鶏肉に水を加えて加熱し、仕込みし、酵素処理、こうじ及び酵母による発酵を行い、あっさく、火入れ、濾過して、製品になる。本研究の鶏肉発酵調味液は、仕込みした後でプロテアーゼ及びグルタミンナーゼで酵素処理し、選択した乳酸菌で乳酸発酵して、その上清の GABA 含量を測定した。

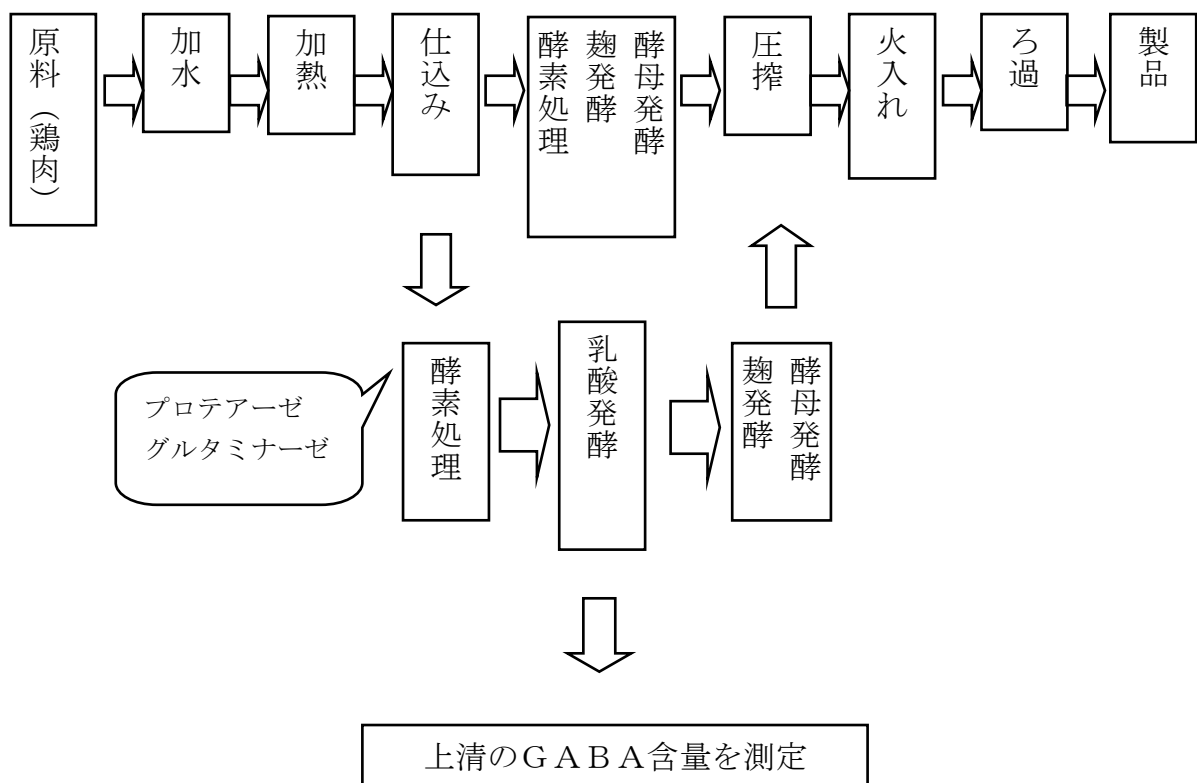


図 4-1 鶏肉調味液の製造方法

(2) 米糖化液の製造法

米糖化液の製造方法は図 4-2 に示す。

米糖化液 A: 無洗米粉の 10% 溶液を α -アミラーゼで澱粉を分解液化し、グルコア

ミラーゼでグルコースに分解して、グルコース濃度 2.7%、固形分含量 10.7%と窒素含量 3.0%にした。

米糖化液 B: 脱脂した無洗米粉と白米各 5%を混合粉碎した溶液を α -アミラーゼで澱粉を分解液化し、グルコアミラーゼでグルコースに分解して、グルコース濃度 3.7%、固形分含量 10.7%と窒素含量 2.0%にした。

米糖化液 C: 白米の 10%溶液を α -アミラーゼで澱粉を分解液化し、グルコアミラーゼでグルコースに分解して、グルコース濃度 3.7%、固形分含量 10.2%と窒素含量 1.2%にした。

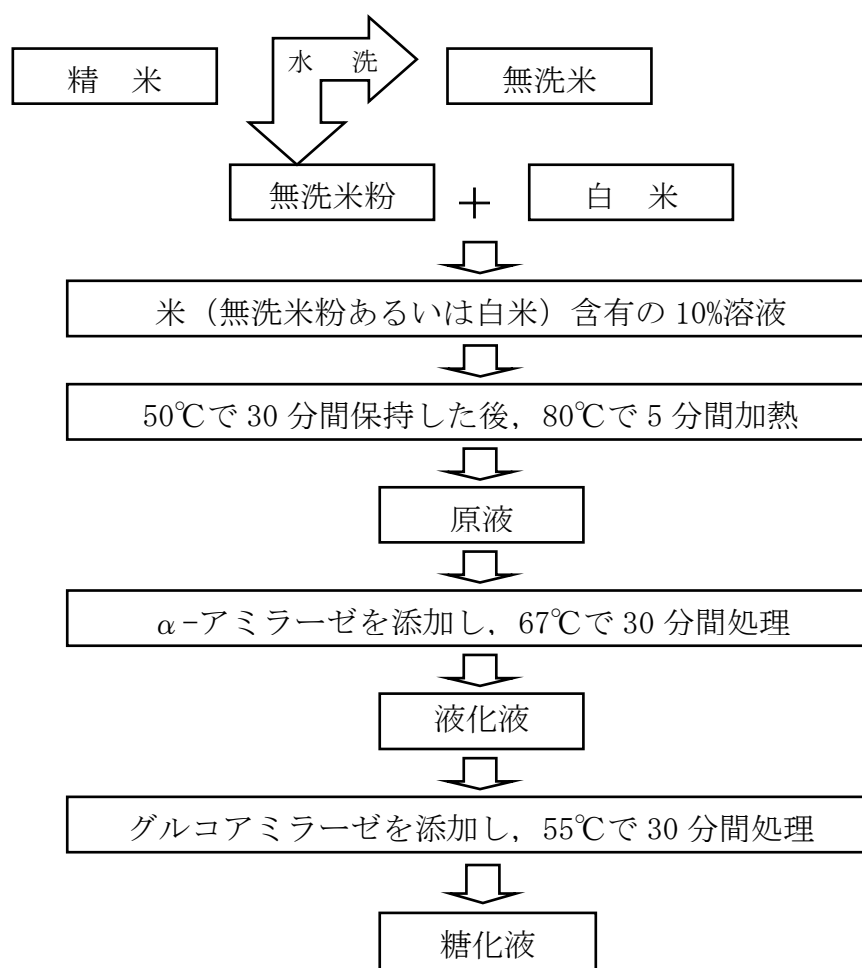


図 4-2 米糖化液の製造方法

2. 供試培地

(1) 乳酸球菌用液体培地 (TYLG)

トリプトン	10g
酵母エキス	5g
グルコース	5g
ラクトース	5g
ツイン 80	1g
L-システイン塩酸塩	0.1g

以上の成分を 1000ml の蒸留水に溶解し、pH を 6.8-7.0 に調整後、121°C15 分間
高圧滅菌する。

(2) 乳酸桿菌用液体培地 (MRS broth, Oxoid, Hampshire, England)

M. R. S 液体培地 (OXOID)	52g
----------------------	-----

以上成分を 1000ml の蒸留水に溶解し、121°C15 分間高圧滅菌した。

(3) 10%窒素源溶液

酵母エキス (DIFCO)	1g
トリプトン (DIFCO)	1g
プロテオーズペプトン N03 (DIFCO)	1g
カザミノ酸 (DIFCO)	1g
ポリペプトン (BBL)	1g
バクトペプトン (DIFCO)	1g

以上の成分を 10ml 蒸留水に溶解し、121°C15 分間滅菌する。

(4) 10%グルタミン酸ナトリウム溶液

グルタミン酸ナトリウム

10g

以上の成分を 100ml 蒸留水に溶解し、121°C15 分間滅菌する。

3. 鶏肉調味液における乳酸発酵の方法

調製後の鶏肉調味液を孔径 0.20 μm のディスクフィルターでろ過して滅菌処理し、選抜した GABA 高生産性乳酸菌株を 2%(v/v) 量で接種し、30°C で 7 日間発酵した。菌株の生育性の目安として、発酵した鶏肉調味液の pH を測定した。また、鶏肉調味液によく生育する乳酸菌を選択し、GABA 生産量を HPLC 法で測定した。

4. 米糖化液における乳酸発酵の方法

酵母エキス、トリプトン、プロテオースペプトン No. 3、ポリペプトン、バクトペプトン、及びカザミノ酸 6 種類の窒素源を、10%の無洗米粉で調製した米糖化液 A にそれぞれ 1%添加し、GABA 高生産性乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* KM を 1%接種し、30°C で 1 から 5 日間培養して、1 日ごとに培養物の GABA 含量を HPLC 法で測定し、KM 株の GABA 生産活性に及ぼす窒素源の影響を調べた。次に、KM 株の生育性及び GABA 生産活性に最も適す窒素源を選択し、1%の窒素源及び 1%のグルタミン酸ナトリウムを米糖化液 A に添加し、3 株 GABA 高生産性乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* KM, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* DH1 及び *Lactobacillus brevis* 1056 をそれぞれ 1%接種し、30°C で 1 から 3 日間培養して、培養物中の GABA 含量を HPLC 法で測定し、米糖化液の乳酸発酵及び GABA 生産に最も適す乳酸菌株を選択した。最後に、10%の無洗米粉で調製した米糖化液 A, 5%の無洗米粉と 5%の白米で調製した米糖化液 B, 及び 10%の白米で調製した米糖化液 C を用い、培養物中の GABA 含量を TLC 法及び HPLC 法で測定し、選択した乳酸菌株の GABA 生産性に及ぼす米糖化液組成の影響を調べた。

結果と考察

1. GABA 高生産性乳酸菌の鶏肉発酵調味液への応用

KM 株と DH1 株は、発酵 7 日目まで pH の低下はほとんど見られず、この 2 株乳酸菌は鶏肉調味液の栄養成分が生育に適さず、調味液での生育性はないものと判断される。一方、1056 株で発酵した鶏肉調味液の pH は、5.62 から 5.16 までに低下した後、徐々に上昇しており、1056 株は鶏肉調味液での生育性と GABA 生産性が見られたものと考えられる。鶏肉調味液中の GABA 生産量を HPLC 法で測定した結果、1056 株は、培養 4 日後で 1.51mg/ml の GABA 生産が確認された。この結果は、本研究で選抜した乳酸菌株の中でも、特に *Lb. brevis* 1056 株は鶏肉調味液での生育に適し、高い GABA 生産活性を示した。3 株乳酸菌で発酵した鶏肉調味液の pH は表 4-1 に示す。また、1056 株で発酵した鶏肉調味液の GABA 生産量及び pH は図 4-3 に示す。白い三角で表示するのは GABA 生産量、黒い三角で表示するのは pH である。

表4-1 選抜した3株乳酸菌で発酵した鶏肉調味液の pH

菌株名	0日	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日
KM	5.62	5.38	5.45	5.40	5.44	5.36	5.28	5.30
DH1	5.62	5.31	5.48	5.44	5.51	5.62	5.36	5.48
1056	5.62	5.18	5.20	5.19	5.16	5.20	5.22	5.32

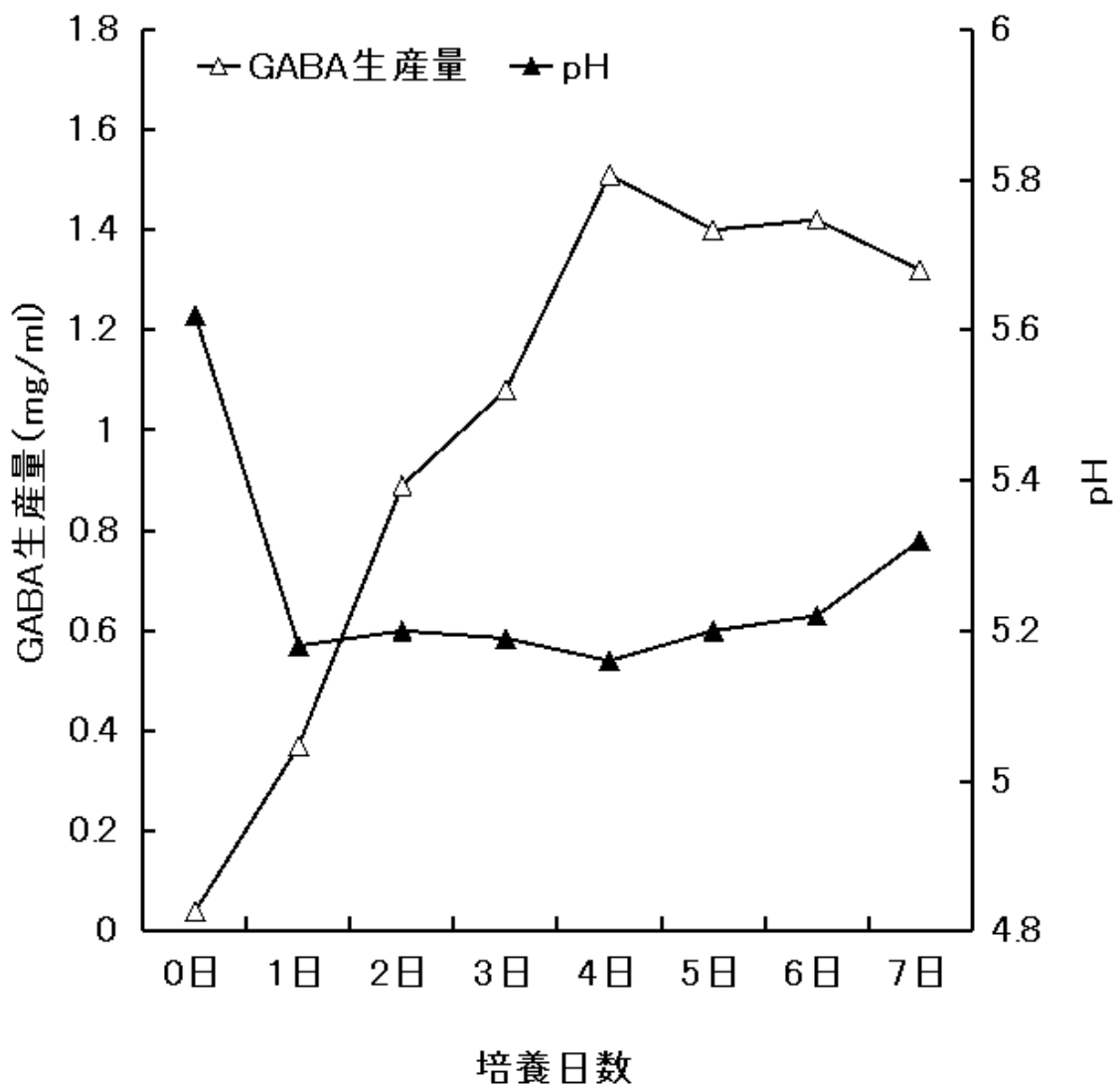


図 4-3 鶏肉調味液における *Lactobacillus brevis* 1056 で発酵した GABA 生産量及び pH の経時的変化

2. GABA 高生産性乳酸菌の米糖化液への応用

6 種類の窒素源を用い、KM 株の GABA 生産活性に及ぼす窒素源の影響を確認した場合、カザミノ酸を窒素源として添加し、KM 株で発酵した米糖化液の GABA 生産量が最も高く、発酵 5 日間で 3.33mg/ml であった。結果は図 4-4 に示している。

10%の無洗米粉で調製した米糖化液に、カザミノ酸とグルタミン酸ナトリウムと共に 1%添加し、3 株乳酸菌で発酵した場合、*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* KM

は、培養 72 時間後で 2.65mg/ml の GABA を生産し、*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* DH1(1.53mg/ml)及び *Lactobacillus brevis* 1056(0.71mg/ml) よりかなり高かった。KM 株で発酵した米糖化液の風味も、他の菌株より良好でした。結果は図 4-5 に示す。

3 種類の米糖化液、つまり 10%の無洗米粉で調製した米糖化液 A、5%の無洗米粉及び 5%の白米で調製した米糖化液 B、及び 10%の白米で調製した米糖化液 C を用い、米糖化液組成が KM 株の GABA 生産活性に及ぼす影響を調べた場合、1%のカザミノ酸及び 1%のグルタミン酸ナトリウムを添加し、KM 株で 120 時間発酵した米糖化液 A の GABA 含量が最も高かった。TLC 法で測定した結果は図 4-6 から図 4-8、HPLC 法で測定したのは図 4-9 に示す。

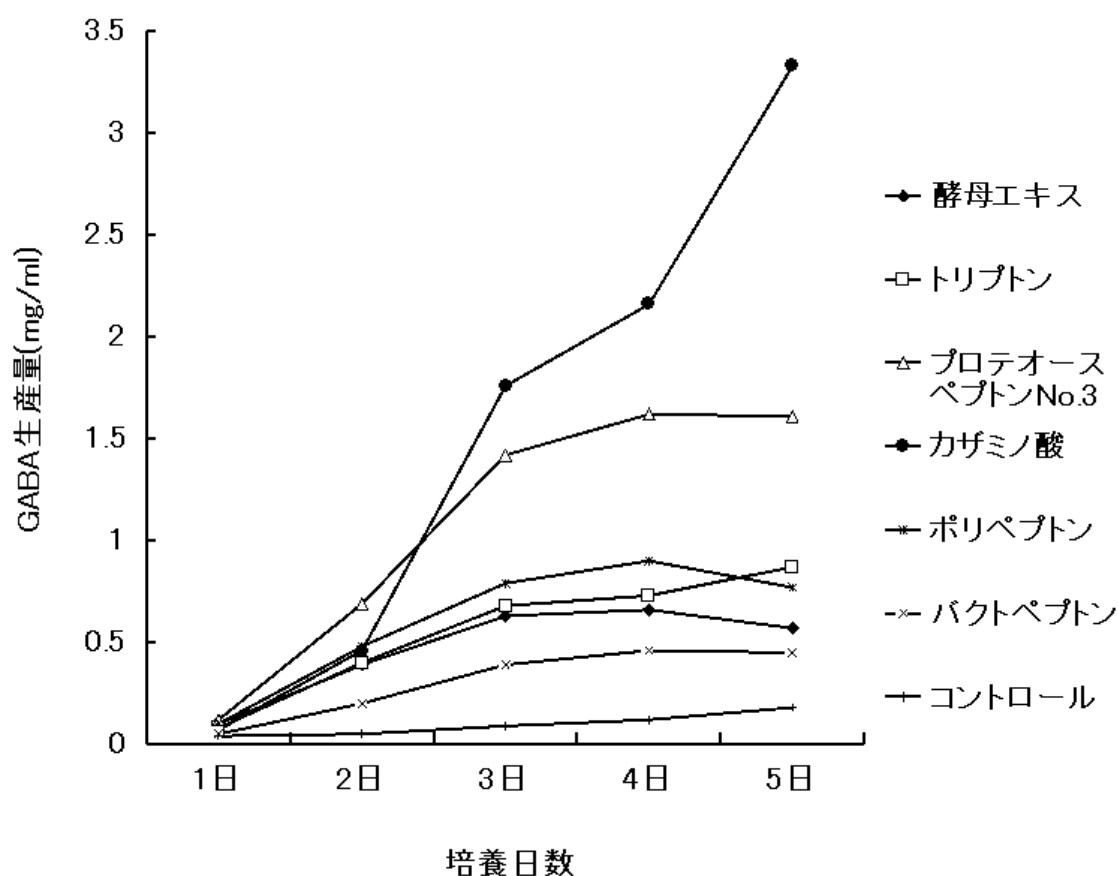


図 4-4 窒素源添加後 *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* KM で発酵した米糖化液における GABA 生産量の経時的变化 (米糖化液の組成：10%無洗米粉)

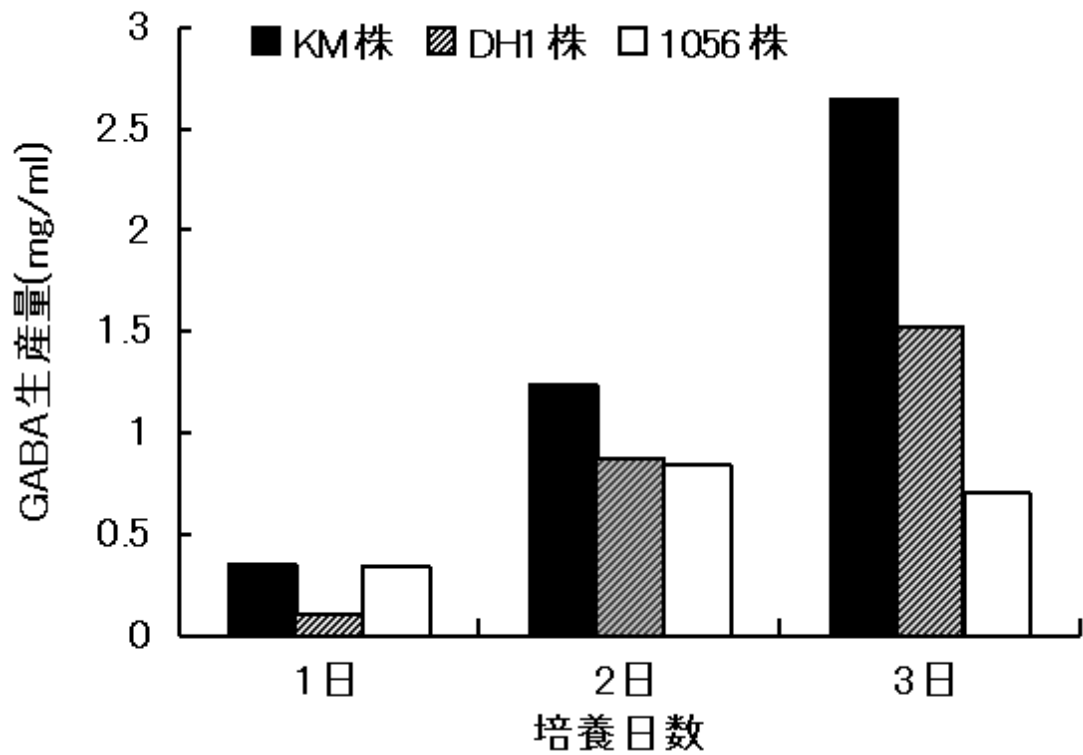


図 4-5 選択した乳酸菌で発酵した米糖化液における GABA 生産量の変化 (米糖化液の組成：10%無洗米粉)

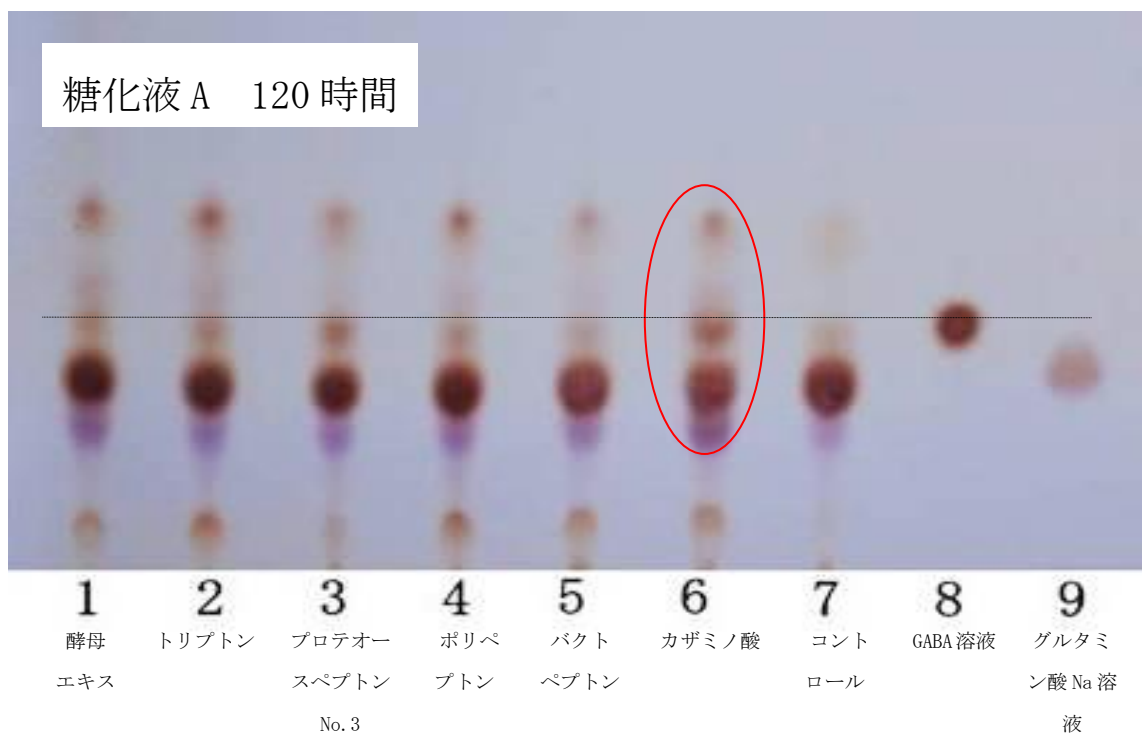


図 4-6 TLC 法で測定した窒素源添加後 *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* KM で発酵した米糖化液 A における GABA 生産量

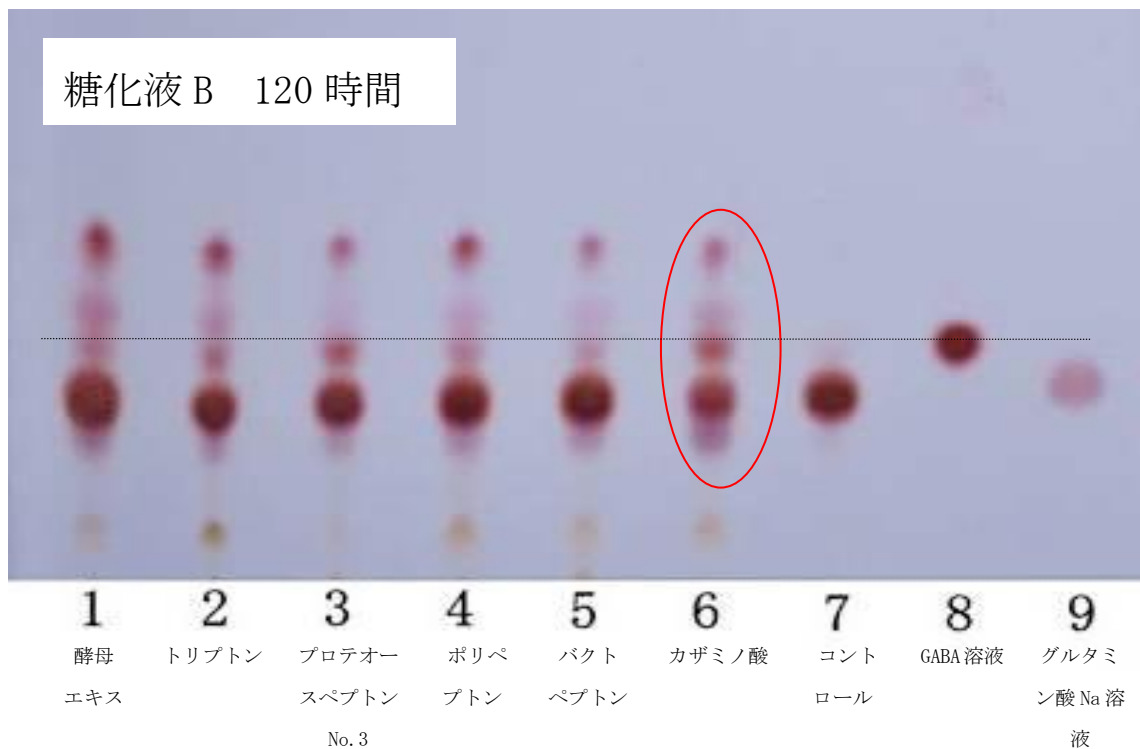


図 4-7 TLC 法で測定した窒素源添加後 *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* KM で発酵した米糖化液 B における GABA 生産量

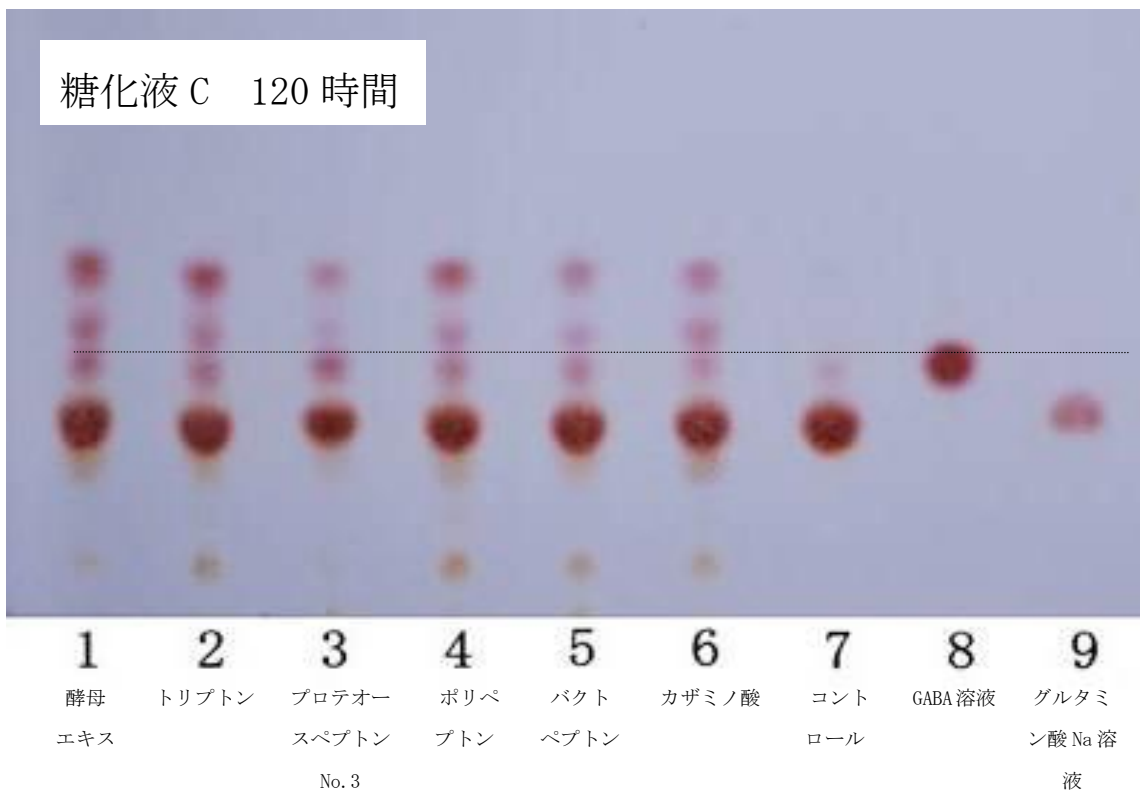


図 4-8 TLC 法で測定した窒素源添加後 *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* KM で発酵した米糖化液 C における GABA 生産量

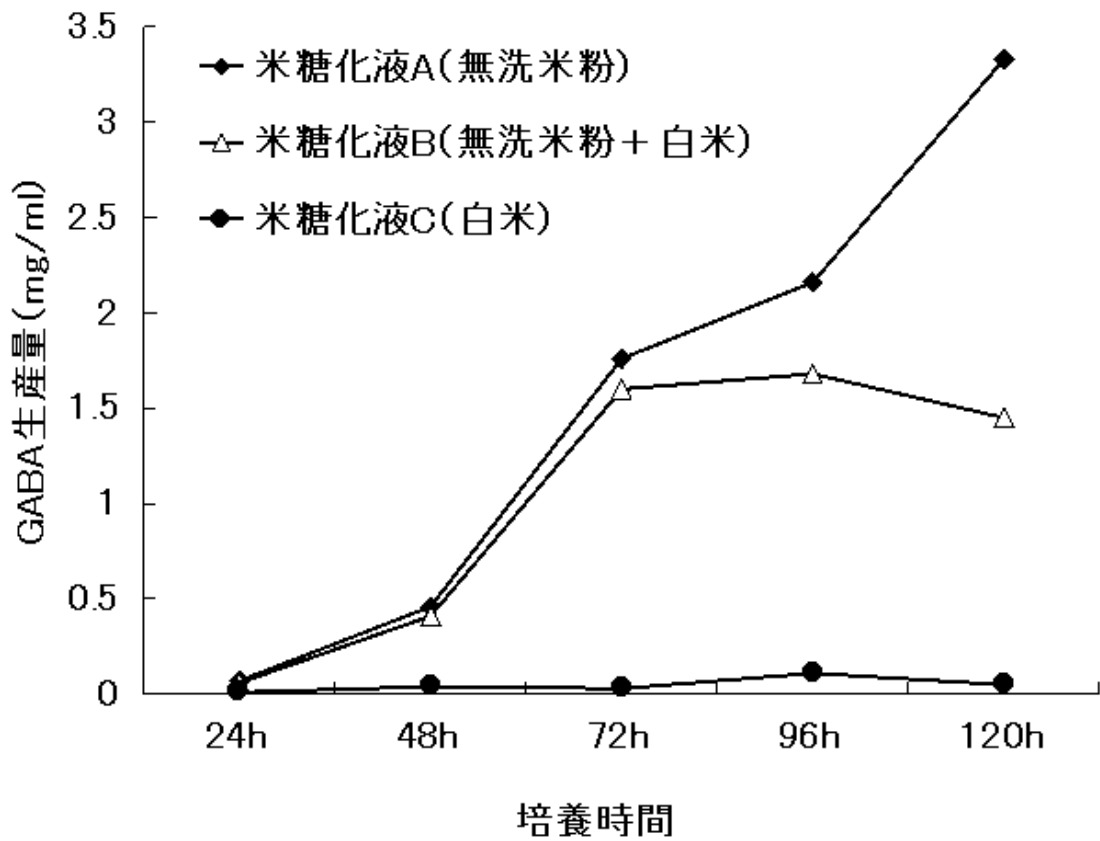


図 4-9 HPLC 法で測定した窒素源カザミノ酸を添加した米糖化液における *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* KM の GABA 生産量の経時的変化

要 約

選抜した 3 株 GABA 高生産性乳酸菌を、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、ミンチ状の鶏肉に調味料を加え加熱処理を行った後、酵素処理を 50°C48 時間行い、上清に乳酸菌液 2%量を接種して適温で一定時間培養させ、培養上清中の GABA を HPLC 法で検出した。1056 株は鶏肉調味液の上清中でもよく生育し、培養 96 時間で 1.51mg/ml の GABA を生産した。GABA の保健効果が 10-20mg 以上の摂取で認められるという過去の報告を考えると、本結果は効果を期待できる十分の値と言える。また、本実験ではグルタミン酸濃度を測定しなかったが、遊離のグルタミン酸量を増やすような酵素剤の選択及び使用により、より多量の GABA を含む調味液の開発が可能であると考えられる。

次に、無洗米粉の 10%溶液を α -アミラーゼで澱粉を分解液化し、グルコアミラーゼでグルコースに分解して、グルコース濃度 5.8%にした米糖化液 A に、1%のグルタミン酸ナトリウム及び 1%のカザミノ酸を入れて、乳酸菌液 1%接種して 24-72 時間培養させ、上清中の GABA 含量を HPLC 法で検出した。3 株乳酸菌のうち、KM 株が米糖化液の乳酸発酵を最も適し、培養 72 時間で 2.65mg/ml の GABA を生産した。また、窒素源の有無と種類及び米糖化液の種類が KM 株の生育性及び GABA 生産量の影響を調べた結果、10%含有の無洗米粉から調製した糖化液に 1%カザミノ酸と 1%グルタミン酸ナトリウムを添加して、KM 株で 12-120 時間発酵すると、GABA 含量は 0.04mg/ml から 3.33mg/ml まで増加した。

第5章 総括

総 括

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。

1. GABA 高生産性乳酸菌のスクリーニングと同定

世界各地の発酵乳製品などから分離した 218 株の乳酸菌を 1% 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、3,000rpm15 分間で遠心分離し、培養上清中の GABA 含量を TLC 法で半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、糖類発酵性、乳酸旋光性、温度生育性などの生理・生化学的性状及び 16SrDNA の部分塩基配列を解析し、DDBJ にて BLAST 法を用いて相同性検索を行った。その結果、中国内モンゴル自治区の酸凝固型チーズであるホロード、マレーシアの発酵乳ダディヒ及びケニアの発酵乳マジワララから分離した 3 株乳酸菌は、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球菌 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。

2. 乳酸菌の GABA 生産活性に及ぼす培養条件の検討

選択した 3 株乳酸菌の GABA 生産活性に及ぼす培地の初発 pH, 培地の初発グルタミン酸ナトリウム濃度及び培養時間の影響について検討した。まず, 培地の初発 pH を変動した場合, 初発 pH が 5.0 の時に GABA 生産性が最も優れており, 培養 72 時間から 96 時間で GABA 生産のピークになった。初発グルタミン酸ナトリウム濃度を 1%, 初発 pH を 5.0 とし, 培養 96 時間での GABA 生産量は 1056 株が 6.34 mg/ml, DH1 株が 5.60 mg/ml, KM 株が 2.87 mg/ml であった。次に, グルタミン酸ナトリウムの濃度を変動した場合, 1056 株は基質となるグルタミン酸ナトリウムの濃度に依存して GABA 生産性が高くなり, 10%グルタミン酸ナトリウムの添加で最大の GABA 生産 (46.32 mg/ml) が認められた。また, 培養後の培地 pH の上昇も大きく, 添加グルタミン酸ナトリウム濃度が 10%で pH7.4 であった。培養時間の影響を調べたところ, 1%グルタミン酸ナトリウムを添加し, 初発 pH が 5.0 の GLYP 培地において, DH1 株及び KM 株では培養 24 時間から GABA 生産が確認され, 培養 120 時間までに GABA 生産量の緩やかな上昇が観察された。一方, 1056 株は, 培養 24 時間後で既に 5.53 mg/ml と十分な GABA 生産を示し, 72 時間までに培養上清中の GABA 含量は 6.56 mg/ml のピークを示した。

3. GABA 高生産性乳酸菌を応用した発酵食品の開発

選択した 3 株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 (総量 769g) を 121°C15 分間滅菌処理し, プロテアーゼ (ビオプラーゼ SP4 とデナチーム AP) 及びグルタミナーゼをそれぞれ 0.28g 添加し, 50°C で 48 時間反応後, 遠心分離し, 上清をろ過して鶏肉調味液を得た。この鶏肉調味液に供試菌株をそれぞれ 2%量接種し, 30°Cで 7 日間培養後, 3,000rpm で 15 分間

遠心分離して、鶏肉発酵調味液の上清の pH 及び GABA 含量を測定した。その結果、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DH1 と *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KM は、鶏肉発酵調味液の栄養成分が生育に適さないものと考えられ、これら 2 株での GABA 生産活性は見られなかった。一方、*Lactobacillus brevis* 1056 は鶏肉発酵調味液での生育が確認され、培養 4 日後で 1.51 mg/ml の GABA 生産量を示した。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 -アミラーゼによって澱粉を液化し、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。また、KM 株の生育性及び GABA 生産性に及ぼす窒素源添加の影響について検討した結果、使用した 6 種類の窒素源はすべて KM 株の生育に促進作用のあることが示唆された。特にカザミノ酸は KM 株の生育性及び GABA 生産性に最も優れていた。無洗米粉の 10%溶液を用いて調製した米糖化液に、1%カザミノ酸及び 1%グルタミン酸ナトリウムを添加した発酵液での GABA 含量は、培養 5 日目で 3.33 mg/ml であった。

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。

謝 辞

本論文の完成に当たり、研究内容の実施と論文の作成及び学会誌への投稿、更に、日本国での留学生活などすべての面におきまして、終始懇篤なる御指導、御鞭撻と御校閲の労を賜りました岡山大学大学院自然科学研究科教授宮本拓恩師に深甚なる謝意を表します。同時に、御指導、御訂正の労を賜りました岡山大学大学院自然科学研究科助教荒川健佑先生及び御叱正の労を賜りました副指導教授の岡山大学大学院自然科学研究科坂口英先生と近藤康博先生にも深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、有益なる御協力及び御支援を賜りましたサタケ株式会社技術本部の金本繁晴役員、尾崎雄一課長、植向直哉研究員、王研究員、及び岡山県農林水産総合センターの栗木隆吉氏に厚くお礼を申し上げます。また、大学における研究生活を通じて研究及び勉学を共にしてくださり、終始有益なる御助言及び御指導を賜りました金山博士、津田治敏博士、烏力吉徳力根博士、蘇敦博士、藤川皓江女史、江島由花女史、川東愛女史、藤原啓氏、ならびに当研究室の学生の方々林将也氏、山神達也氏などに深く感謝をいたします。

最後に、私の留学生生活を支援し、激励して下さった友人の皆様ならびに家族にも感謝の意を表します。特に、(株)農微生物発酵研究所所長原和志氏、岡山大学環境理工学部沖陽子先生、香川大学農学部高橋道彦先生に喪心より深謝いたします。

参考文献

1. 小崎道雄監修, 内村泰・岡田早苗. 「乳酸菌実験マニュアルー分離から同定までー」. 朝倉書店. 東京. p1-20, 28-31, 34-40(1992).
2. 水島昭二. 「ホモ乳酸発酵, 乳酸菌の研究」. 北原覚雄編, 東京大学出版. 東京. p34(1996).
3. 岡田早苗. 乳酸菌の定義と分離・同定, 「乳酸菌の科学と技術」乳酸菌研究集談会編, 学会出版センター. 東京. p10-11(1996).
4. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, E. M., and Holt, J. G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins. Baltimore. P1043-1075, 1082-1092, 1208-1234(1986).
5. Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H., *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 1 Blackie Academic & Professional. London. p8-49, 235-278(1996).
6. 細野明義. 「発酵乳の科学ー乳酸菌の機能と保健効果ー」. アイケイコーポレーション. 神奈川. P187-191(2002).
7. 岡田早苗. 乳酸菌の定義と分離・同定, 「乳酸菌の科学と技術」乳酸菌研究集談会編, 学会出版センター. 東京. p13(2003).
8. 細野明義. 「発酵乳の科学ー乳酸菌の機能と保健効果ー」. アイケイコーポレーション. 神奈川. p52-53(2002).
9. 小崎道雄・佐藤英一. 「乳酸菌の新しい発酵系譜」. 雪印乳業健康生活研究所編, 中央法規出版株式会社. 東京. p1-6(2004).
10. 須見洋行. 「食品機能学への招待ー機能性食品とその効能ー」. 三共出版. 東京. p2-6(1995).

11. 藤澤倫彦・中村康則：早川和仁・近藤しずき・細野明義・八村敏志・保井久子・福島浩平・鈴木秀幸・高橋賢一・志田寛・清水金忠・榎木雅夫・何方・原田岳・飯野久和・信田幸大・鈴木重徳・五十君静信. プロバイオティクスの機能と利用, 「乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス」. 日本乳酸菌学会編. 檜山爲次郎発行. 京都大学学術出版会. p3(2010).
12. 光岡知足. 「ビフィズス菌の研究」. 第1版. 日本ビフィズス菌研究センター. 東京. p23(1994).
13. Vollaard, E. J., Clasener H. A. L., Colonization resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 409-414(1994).
14. Rao, D. R., Chawan, C. B., Pulusin, S. R., Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol and hepatic sholestergenesi s in rats. *J. Food Sci.*, 46, 1339-1341(1981).
15. Mann, G. V. and Spoerry, A., Studies of a surfactant and cholesteremia in the Masai., *Am. J. Clin. Nutr.*, 27, 464-469(1974).
16. Pearce, J., Effects of milk and fermented dairy products on the blood cholesterol content and profile of mammals in relation to coronary heart disease., *Int. Dairy J.*, 6, 661-672(1996).
17. Walker, D. K. and Gilliland, S. E., Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*., *J. Dairy Sci.*, 76, 956-961(1993).
18. 伊藤敏敏, 発酵乳用乳酸菌の持つ機能性. 日本畜産学会報, 63, 1276(1992).
19. 横倉輝男, 乳酸菌の抗腫傷効果と免疫賦活作用. 酪農科学・食品の研究,

- 43, A141-A150(1994).
20. Hosono, A., Tanabe, T. and Otani, H., Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid hydrolyzates. *Milchissenschaft*, 45, 647-650(1990).
 21. Hosono, A., Wardojo, R., Otani, H., Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the Mutagenicities of Volatile Nitrosamines. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1639-1643(1990).
 22. 田辺勉, 発酵乳由来の乳酸菌の抗変異原性と変異原物質吸着. *Japanese J. Dairy Food Sci.*, 45, 17-21(1996).
 23. Roberts, P. R., Burney, J. D., Black, K. W., Zaloga, G. P., Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60, 332-337(1999).
 24. Nakamura, Y., Studies on Anti-Hypertensive Peptides in Milk Fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Bioscience Microflora*, 23, 131-138 (2004).
 25. Yamamoto, N., Akion, A. and Takano, T., Antihypertensive effect of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 776-778(1994).
 26. Fernandez, M., Margolles, A., Suarez, J. E. and Mayo, B. *Int. J. Food Microbio.*, 48, 113-123(1999).
 27. Saito, Y., Nakamura, K., Kawatou, A. and Imayasu, S., *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 66, 1081-1087(1992).

28. Shu, Q. , Bird, S. H, Gill, H. S. , Rowe, J. B. , Immunological cross-reactivity between the vaccine and other isolates of *Streptococcus bovis* and *Lactobacillus*. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* , 26, 153-158(1999).
29. Perdigon, J. M. and Alvarez, S. , Probiotic, Fuller Red. *Chapman and Hallsci. Ltd.* , 145(1992).
30. 森昭胤.「脳とアミノ酸」. 中外医学社. 東京. p50-58, 126-134, 219-221(1976).
31. 高垣玄吉郎・永津俊治.「神経伝達物質：アミノ酸とアミン」講談社. 東京. p73-76, 95-98(1981).
32. 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, *生物工学会誌*, 85(3), 109-114(2007).
33. Cho, Yu Ran, Ji Yoon Chang, Hae Choon Chang, Production of γ -Aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* Isolated from Kimchi and its Neuroprotective Effect on Neuronal Cells, *J. Microbiol. Biotechnol.* , 17(1), 104-109(2007).
34. 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, *生物工学会誌*, 75(4), 239-244(1997).
35. S. Siragusa, M. De Angeils, R. Di Cagno, C. G. Rizzello, R. Coda, M. Gobbetti , Synthesis of γ -Aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Varietr of Italian Cheeses, *Appl. Environ. Microbiol.* , 73(22), 7283-7290(2007).
36. M. Nomura, H. Kimoto, Y. Soneya, S. Furukawa, I. Suzuki, Production of γ -Aminobutyric Acid By Cheese Starters During Cheese Ripening, *J. Dairy*

Sci., 81(6), 1486-1491(1998).

37. 藤澤倫彦・中村康則：早川和仁・近藤しずき・細野明義・八村敏志・保井久子・福島浩平・鈴木秀幸・高橋賢一・志田寛・清水金忠・榎木雅夫・何方・原田岳・飯野久和・信田幸大・鈴木重徳・五十君静信. プロバイオティクスの機能と利用, 「乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス」. 日本乳酸菌学会編. 檜山爲次郎発行. 京都大学学術出版会. 京都. p340-344, 504-505(2010).
38. 細野明義・沖谷明絃・吉川正明・八田一. 「畜産食品の事典」. 朝倉書店. 東京. p466-468(2002).
39. 有原圭三, 微生物や酵素を利用した保健的な付加価値の高い食肉製品の開発, 畜産の情報, 155, 24-28(2002).
40. 阿久澤良造・坂田亮一・島崎敬一・服部昭仁. 「乳肉卵の機能と利用」. アイ・ケイコーポレーション. 神奈川. p328-353(2005).
41. 細野明義・沖谷明絃・吉川正明・八田一. 「畜産食品の事典」. 朝倉書店. 東京. p192(2002).
42. 沖谷明絃. 「肉の科学」. 朝倉書店. 東京. p 36-37(1997).
43. 石谷孝佑・大坪研一. 「米の科学」. 竹生新治郎監修. 朝倉書店. 東京. p1-2(1997).
44. 石谷孝佑. 「米の事典－稲作からゲノムまで」. 幸書房. 東京. p176-177, 187(2002).
45. 石谷孝佑. 「米の事典－稲作からゲノムまで」. 幸書房. 東京. p177(2002).
46. 大塚正盛, 岡田早苗, 内村泰, 駒形和男, 乳酸菌同定のため生成乳酸タイプの簡易判定法：高速液体クロマトグラフィー（光学分割カラム）による異性

- 体の分割, 生物工学会誌, 72(2), 81-86(1994).
47. Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., Tsurumi, K. and Saito, T., Microbial community analysis of food-spoilage bacteria in commercial custard creams using culture-dependent and independent methods. *J. Dairy Sci.*, 91, 2938-2946(2008).
 48. Li, H. and Cao, Y., Lactic acid bacteriacell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*, 39, 1107-1116(2010).
 49. Noriko Komatsuzaki, Toshihide Nakamura¹, Toshinori Kimura, Junshima, Characterization of Glutamate Decarboxylase from a High γ -Aminobutyric Acid(GABA)-Producer, *Lactobacillus paracasei*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(2), 278-285(2008).
 50. 榑原正樹・吉川典孝・太郎田博之・稲福桂一郎・宮城健. スピルリナの乳酸発酵による γ -アミノ酪酸 (GABA) の高含有化及び血圧降下作用, *DIC Technical Review*, 12, 13-19(2006).
 51. 特開 2008-86292, 永谷園 (株), γ -アミノ酪酸含有食品素材の製造方法 (2008).
 52. 特開 2001-120179, ヤクルト本社 (株), GABA 含有発酵乳の製造方法(2001).
 53. 特開 2000-308457, バイオアルビン研究所 (株), 乳酸発酵食品の製造方法 (2000).
 54. 独立行政法人国立健康栄養研究所. 特定保健用食品許可(承認)品目一覧表について, <http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin957.xls>