

γ -アミノ酪酸 (GABA) 生産乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* TOYAMA の「かぶらずし」への応用

寺島晃也^{1)*}, 多田耕太郎²⁾, 加藤一郎¹⁾, 中川義久¹⁾, 平野 寛¹⁾, 鈴木敏郎²⁾

¹⁾富山県農林水産総合技術センター食品研究所 〒939-8153 富山県富山市吉岡 360

²⁾東京農業大学農学部畜産学科 〒243-0034 神奈川県厚木市船子 1737

γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid: GABA) は哺乳動物の中樞神経において抑制系の神経伝達物質として関与するアミノ酸で、血圧安定化作用や自律神経障害改善作用、肝機能改善作用などの生理作用が報告されており (中村ら, 2000; 岡田ら, 2000; 大森ら, 1987), 茶やチョコレート, 乳飲料などの GABA 含有食品が多数販売され, 大きな市場を形成している. GABA はグルタミン酸デカルボキシラーゼの作用によりグルタミン酸が脱炭酸され生成するが, 近年, 乳酸菌の一部に GABA 生産能を有するものが見いだされ, 乳酸菌により GABA 含量を高めた漬物やチーズ等の製造が試みられている (愛宕, 2002; 野村ら, 1999; 早川ら, 1997; 上野義栄ら, 2007). 著者らは富山県産漬物から GABA 生産能を有する乳酸菌を探索した結果, 糠漬けから GABA 生産乳酸菌株 (TOYAMA) を分離し, これを *Pediococcus acidilactici* と同定した (寺島ら, 2008). 本報告では糠漬けから分離した *P. acidilactici* (以下 PA-TOYAMA と略す) をスターターとして用い, 伝統的な漬物である「かぶらずし」を製造した. かぶらずしは北陸地方において冬期に製造される伝統的な発酵食品で, 馴れずしの一種である. 主原料はかぶ, サバ, 米麴で, 塩漬けた大かぶに酢漬けたサバを挟み, これに米麴を混ぜ漬け込み発酵させ製造される. 米麴の糖化による甘みと, 乳酸発酵による酸味が合わさった独特の風味が特徴である. 現在, かぶらずしの製造に乳酸菌スターターは用いられておらず, 原材料由来の乳酸菌 (入澤ら, 2010) による発酵により, その風味が醸成される. かぶらずしに関する研究は, そのほとんどが成分や食味などの特徴を検討したものであり (寺沢ら, 1998; 上野真理子ら, 2007), 乳酸菌スターターを用いて製造した事例はこれまで報告されていない. また, かぶ

らずしのような地方独特の食品を, その地方から分離した微生物を利用して品質を向上させることは, 特色のある地域食品が求められている現在, 意義のあることと考えられる. そこで, 本報告では富山県産食品から分離された GABA 生産乳酸菌 PA-TOYAMA をスターターとしてかぶらずしを製造し, 発酵中の微生物変化, 化学的変化およびその品質について検討した.

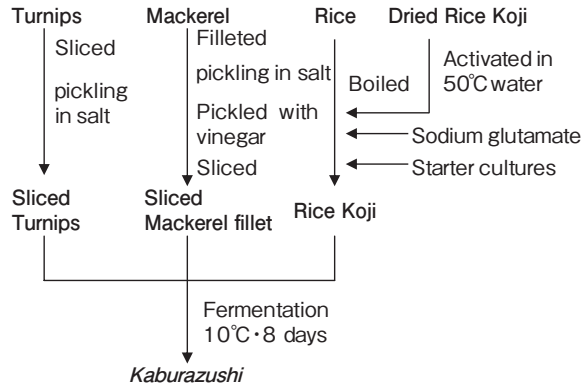
PA-TOYAMA の前培養には MRS 培地を用い, 30°C, 24 時間静置培養し, 培養後, 遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) で集菌し, 滅菌生理食塩水で 2 回洗浄を行い, 濁度を指標に 10^8 cells/ml に調整したものを接種用菌液とした. かぶらずしの製造は Fig. 1 の方法に従って行った. 富山県産早生大かぶを洗浄後, 皮を剥き, 厚さ 20 mm にスライスした. これに 5% の食塩を添加し, 5°C で 3 日間塩漬け後, 溶出した水を廃棄した. サバは生サバを三枚に下ろし, 等量の食塩で 5°C, 3 日間塩漬け後, 食塩を水洗い除去し, 一晚酢漬けにした. 米麴はかぶらずし用乾燥米麴 (南日味噌醤油株式会社製) を用い, 加水後 50°C で 6 時間糖化させた米麴に蒸米を等量混ぜ, さらに食品添加用グルタミン酸ナトリウム (仕上がり総重量の 1%) と乳酸菌スターターを 10^7 cells/g になるように添加し, よく混ぜ合わせた. かぶ (3.0 kg) に切り込みを入れ, スライスしたサバ (0.3 kg) を挟み込み, 米麴 (1.0 kg) を合わせた後, 重しをして 10°C で 8 日間発酵させ, かぶらずしを得た. 発酵期間中, 毎日サンプリングを行い, 以後の試料とした. なお, スターターとして PA-TOYAMA を添加した試験区を PA-TOYAMA 区, スターターを添加しなかった試験区をコントロール区とした.

はじめに, 乳酸菌数の変化を調べた (Fig. 2). 試料 10 g を 90 ml の滅菌生理食塩水を加え均質化したものについて, BCP 加プレートカウント寒天培地 (ニッスイ) を用い, 37°C で 72 時間, 平板培養し周囲が黄変したコロニーを計測した. その結果, 発酵開始時, コントロール区は原料由来と考えられる乳酸菌が

*Corresponding author

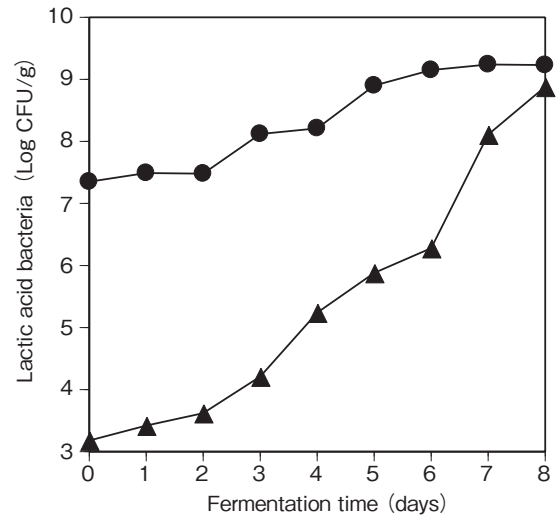
E-mail: teruya@agri.pref.toyama.jp

Accepted: January 5, 2012

Fig. 1 Preparation of *Kaburazushi*

1.8×10^3 CFU/g 存在し、発酵1日目から経日とともに増殖が見られ、発酵7日目から急速に増殖し、8日目には 8.8×10^7 CFU/g となった。一方、PA-TOYAMA 区は目標接種量どおりに発酵開始時の乳酸菌数は 10^7 CFU/g レベルにあり、発酵2日目から3日目にかけて増殖が見られ、6日目に 10^9 CFU/g レベルとなり、8日目まで維持した。このことから、PA-TOYAMA は今回実施したかぶらずしの発酵条件 (10°C) において増殖可能であることが明らかになった。

次に、遊離アミノ酸量を調べた。試料2~3 g に6% トリクロロ酢酸を30 ml 加えホモジナイズ後、遠心分離し (3000 rpm, 10分間)、上澄を採取した。これを3回繰り返した後、90% 水酸化カリウムを用い pH 2.0 に調整後50 ml に定容し、0.45 μ m フィルターでろ過した。続いてろ液をアミノ酸分析計 (日本電子 JLC500) を用い、イオン交換クロマトグラフィーで分離した後に、ニンヒドリン試薬で反応させ可視吸光検出器で検出した。プレカラムは LCR-7 (4.0 mmID \times 70 mmL)、分析カラムは LCR-6 (4.0 mmID \times 120 mmL) を用いた。なお、総遊離アミノ酸量はタンパク質を構成するアミノ酸のうち、製造時に添加しているグルタミン酸を除く19種類のアミノ酸 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asp, Asn, Gln, Lys, Arg, Cys, Met, Phe, Tyr, Trp, His, Pro) の総量とした。Fig. 3に発酵期間におけるGABA量とグルタミン酸量の変化を示した。PA-TOYAMA 区 (Fig. 3a) は発酵4日目からGABAの生成が見られ、生成量は経日とともに増加し、5日目 308 mg/100 g, 6日目 493 mg/100 g, 7日目 561 mg/100 g となり、8日目には 580 mg/100 g のGABAが生成された。グルタミン酸はGABAの生成とともに減少し、発酵7日目にはほぼ全てのグルタミン酸がGABAに変換さ

Fig. 2 Changes in lactic acid bacterial counts during fermentation of *Kaburazushi*
●- PA-TOYAMA, ▲- Control

れた。一方、コントロール区ではGABAの生成は認められず、グルタミン酸量にも変化はなかった (Fig. 3b)。このことから、PA-TOYAMA は、かぶらずし中において、高いGABA生成能を有することが明らかとなった。グルタミン酸を除く総遊離アミノ酸量は、製造直後は両区ともに 330 mg/100 g であり、発酵8日目ではPA-TOYAMA 区が 361 mg/100 g, コントロール区が 357 mg/100 g と、発酵期間中ほとんど増減は認められなかった。個々のアミノ酸についても発酵中の変化は小さく、PA-TOYAMA 区とコントロール区の両区間に差は認められなかった (データ省略)。

次に、有機酸量を調べるため、遊離アミノ酸測定で用いた検液を有機酸分析システム (島津製作所) により分析した。分離はイオン排除クロマトグラフィーで、カラムは Shim-pack SCR-101H (8.0 mmID \times 300 mmL) および SCR-102H (7.9 mmID \times 300 mmL) を、検出にはポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出法を、溶離液には 5mM p-トルエンスルホン酸を用い、流速 0.8 ml/min で溶出し検出した。Table 1 に発酵8日目のPA-TOYAMA 区、コントロール区の有機酸組成を示した。乳酸、クエン酸、酢酸、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸が検出され、特に乳酸量に大きな差があり、PA-TOYAMA 区が 938 mg/100 g, コントロール区が 422 mg/100 g となった。クエン酸、リンゴ酸、フマル酸についてはPA-TOYAMA 区が多く、酢酸、コハク酸についてはコントロール区が多くなった。酒石酸については両区に差は認められな

かった。有機酸の総量は、乳酸量が多いことから PA-TOYAMA 区が 1112 mg/100 g とコントロール区 (593 mg/100 g) に比べ多くなった。富山県内の市販かぶらずしの乳酸量は、最も少ない製品で 12.5 mg/100 g、多い製品で 654.9 mg/100 g と報告されており (上野真理子ら, 2007), PA-TOYAMA 区は市販製品に比べ、乳酸量が多く、酸味の強いものとなった。Fig. 4 に発酵期間における乳酸量の変化を示した。PA-TOYAMA 区は発酵 2 日目より乳酸が生成され、発酵日数が進むに従い増加し、4 日目以降に大きな増加が見られ、6 日目 470 mg/100 g、7 日目 620 mg/100 g、8 日目には 938 mg/100 g となった。コントロール区は発酵 6 日目から乳酸が生成され、発酵 7 日目に急激に増加し 328 mg/100 g、8 日目には 422 mg/100 g となった。このように、PA-TOYAMA 区ではコントロール区に比べ発酵期間中の乳酸量は高く推移した。

次に、pH の変化を調べた (Fig. 5)。pH は乳酸菌の測定で用いたホモジネート試料をろ過後、ろ液を pH メーター (堀場製作所製 M-12) で測定した。その結果、製造直後の pH は両区とも 5.9 であった。

PA-TOYAMA 区は発酵 1 日目から pH が低下し、発酵 4 日目で 5.1 まで低下した。4 日目から 6 日目にかけての低下は緩慢であったが、7 日目以降は大きく低下し、8 日目の pH は 4.5 となった。一方、コントロール区は発酵 5 日目までは pH の低下は見られず、6 日目以降急激に低下し、8 日目の pH は PA-TOYAMA 区より低い 4.3 となった。pH の低下と乳酸の生成 (Fig. 4) は連動しており、コントロール区では 6 日目から乳酸生成量が大きく増加していることから、pH の急激な低下がおきたと推察された。PA-TOYAMA 区はコントロール区に比べて乳酸生成量は多いものの、発酵 4 日目から 6 日目に GABA の生成が進み (Fig. 3a), GABA 生成時のグルタミン酸の脱炭酸による pH 上昇作用 (Sanders *et al.*, 1998) により、pH の低下が緩慢になり、その後、7 日目にグルタミン酸が消失したことにより (Fig. 3a), pH は再び大きく低下したものと推察された。

次に、発酵 6, 7, 8 日目のかぶらずし (PA-TOYAMA 区) について食感、味覚および香りをかぶらずしの食味試験に精通している 3 人で評価した。その結果、6,

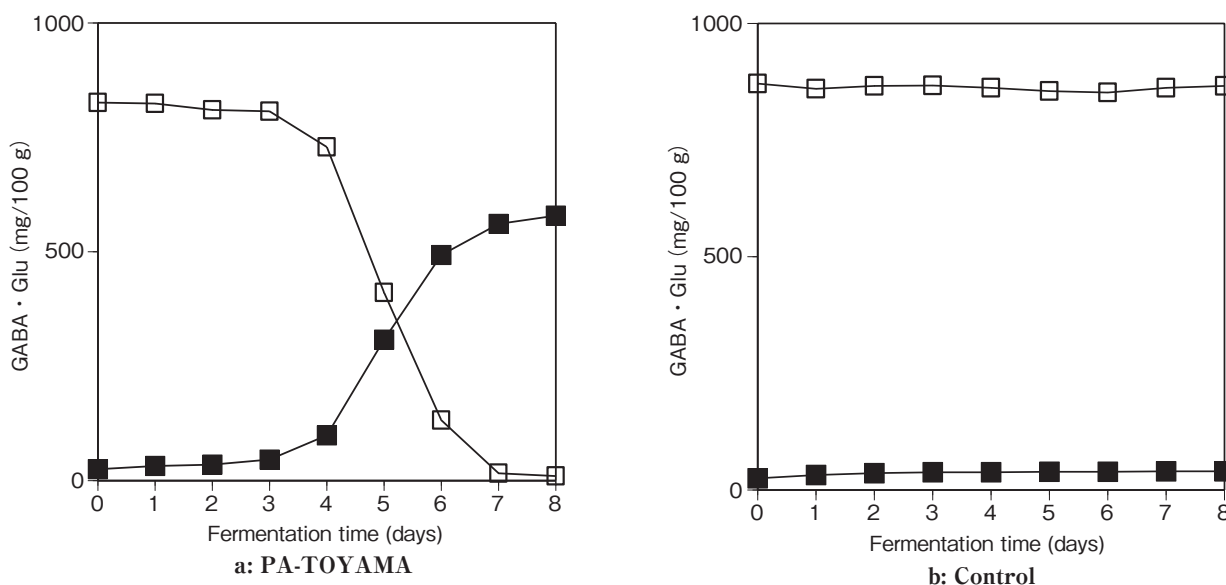


Fig. 3 Changes in GABA and Glutamic acid content during fermentation of *Kaburazushi*
-■- GABA, -□- Glutamic acid

Table 1 Organic acid content of *Kaburazushi**

	Lactic acid	Citric acid	Acetic acid	Malic acid	Tartaric acid	Succinic acid	Fumaric acid	Total
PA-TOYAMA	938	19.6	125	19.1	5.0	3.7	1.9	1112
Control	422	2.1	148	5.3	5.1	9.5	0.7	593

(mg/100g) *: *Kaburazushi* was fermented at 10°C for 8 days

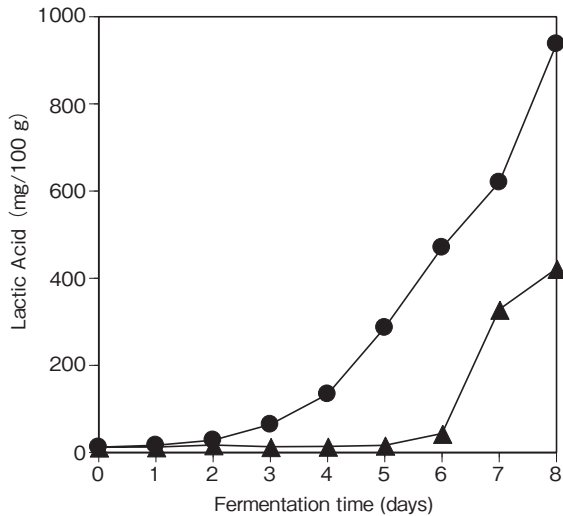


Fig. 4 Changes in lactic acid content during fermentation of *Kaburazushi*
 -●- PA-TOYAMA, -▲- Control

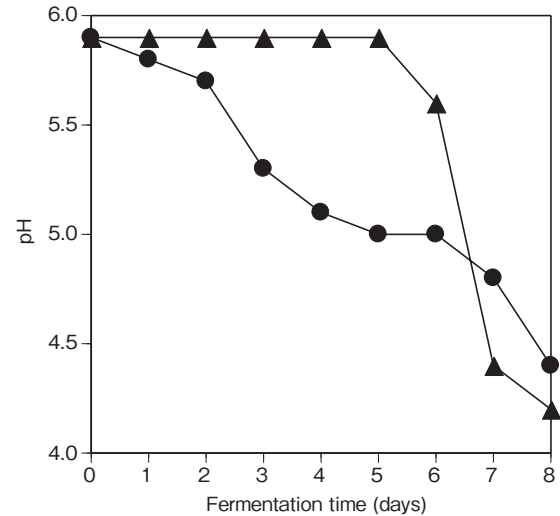


Fig. 5 Changes in pH values during fermentation of *Kaburazushi*
 -●- PA-TOYAMA, -▲- Control

7, 8日目とも腐敗は認められず, 外観, 菌触り, 味, 風味とも良好であった. 発酵6, 7日目のものについては, 米麴の甘みとすっきりとした爽やかな酸味のバランスが良好で高い評価となった. 8日目のものについては, 酸味が強く感じられ, 発酵6, 7日目に比べ低い評価となった. この結果から, 発酵は6~7日間が適当であると推察された.

以上の結果, GABA生産乳酸菌 PA-TOYAMA をスターターとして用いて製造したかぶらずしの GABA 含量は, 580 mg/100 g と市販かぶらずし (富山県内 13 社 18 製品の平均 45 mg/100 g) に比べ多量の GABA を含有していた. 市販かぶらずしは乳酸発酵がほとんど行われぬ即醸タイプと乳酸発酵を進めた醸成タイプに分けることができ, 前者は乳酸菌および乳酸が少なく, 後者は多いという特徴がある. 乳酸菌数, 乳酸量, pH の分析結果より, PA-TOYAMA を用いて製造したかぶらずしは酸味が強い醸成タイプとなった. 官能試験の結果, 外観, 菌触り, 味, 風味とも良好で, 米麴の甘みとすっきりとした爽やかな酸味のバランスが調和した, 市販品の醸成タイプと遜色のないものとなった. また, 製造したかぶらずしからは, 食中毒菌 (黄色ブドウ球菌, 大腸菌, サルモネラ) は検出されず, 安全性が確認された. 発酵時間については, GABA の生成時期と官能試験の結果より, 7 日間行のが適当であると考えられた.

PA-TOYAMA をスターターとして製造したかぶらずしは多量の GABA を含有し, かつ品質も良好なも

のとなった. この結果から, PA-TOYAMA はスターターとして, かぶらずしの製造に実用化が可能であると考えられた. 今回, 富山県の伝統食品であるかぶらずしを同地域内から分離した乳酸菌を利用して, その品質向上を図ることができた. 今後, PA-TOYAMA をかぶらずしだけでなく, 様々な食品に応用し, 健康機能を有する特徴のある地域食品の創出を試みる予定である. 現在, かぶらずしをはじめ, 多くの地域食品は出荷額の減少傾向が続いているが, 健康機能成分である GABA を多量に含有した食品が製造されることで, その消費拡大が期待される.

文献

- 愛宕世高 2002. 漬物由来微生物を用いた GABA 含有発酵液および機能性素材の開発. *ジャパンフードサイエンス* **2002-9**: 85-90.
- 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 γ -アミノ酪酸の生産. *生物工学会誌* **75**: 239-244.
- 入澤友啓, 田中尚人, 高野克己, 岡田早苗 2010. かぶらずしに生息する乳酸菌の分離と同定. *日本食品保蔵科学会誌* **36**: 83-87.
- 中村寿雄, 松林恒夫, 蒲池加寿子, 長谷川節, 安藤洋太郎, 大森正司 2000. γ -アミノ酪酸 (GABA) 富化クロレラは高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧上昇を抑制する. *日本農芸化学会誌* **74**: 907-909.
- 野村 将, 染谷幸雄, 古川左近, 鈴木一郎 1999. 熱

- 処理した *Lactococcus lactis* 添加によるチーズへの γ -アミノ酪酸蓄積法. 日本畜産学会報 **70**: 397-402.
- 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 2000. γ -アミノ酪酸蓄積脱脂コメ胚芽の経口投与における更年期障害及び初老期精神障害に対する効果. 日本食品科学工学会誌 **47**: 596-603.
- 大森正司, 矢野とし子, 岡田順子, 津志田藤二郎, 村井敏信, 樋口 満 1987. 嫌気処理茶 (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**: 1449-1451.
- Sanders, J.W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J.R., Venema, G. & Kok, J. 1998. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. Mol. Microbiol. **27**: 299-310.
- 寺沢なお子, 出村瑞恵, 戸田桃子 1998. かぶらずしの糖, 有機酸及び遊離アミノ酸組成. 日本食品科学工学会誌 **45**: 149-154.
- 寺島晃也, 鹿島真樹, 多田耕太郎 2008. γ -アミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌の分離と GABA 生産特性の解明. 富山県食品研究所研究報告 **6**: 45-49.
- 上野義栄, 平賀和三, 森 義治, 小田耕平 2007. 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**: 109-114.
- 上野真理子, 寺島晃也, 多田耕太郎, 山口静子 2007. 富山県産かぶらずしの理化学特性と食味. 日本食品科学工学会誌 **54**: 118-127.

Kaburazushi fermented by *Pediococcus acidilactici* TOYAMA,
a lactic acid bacterium producing γ -aminobutyric acid (GABA)

Teruya Terashima¹⁾, Kotaro Tada²⁾, Ichiro Kato¹⁾, Yoshihisa Nakagawa¹⁾, Hiroshi Hirano¹⁾ and Toshiro Suzuki²⁾

¹⁾Toyama Prefectural Agricultural, Forestry & Fisheries Research Center, Food Research Institute

²⁾Department of Agriculture, Faculty of Animal Science, Tokyo University of Agriculture

By using *Pediococcus acidilactici* TOYAMA, a lactic acid bacterium that produces γ -aminobutyric acid (GABA), as a starter, *Kaburazushi*, traditional turnip pickle of Toyama Prefecture was made on an experimental basis. The experimental *Kaburazushi* contained 580 mg/100 g of GABA, compared to 45 mg/100 g of GABA based on average of 18 commercial *Kaburazushi*. Furthermore, the experimental *Kaburazushi* contained 938 mg/100 g of lactic acid, whereas the commercial *Kaburazushi* did 12.5 to 654.9 mg/100 g. As a result, the experimental *Kaburazushi* was more sour than the commercial *Kaburazushi*. The experimental *Kaburazushi* had a sour taste and its flavor was as good as the commercial *Kaburazushi*. It was indicated that 7-day fermentation is optimal for the production of GABA-containing *Kaburazushi* by *P. acidilactici* TOYAMA, in view of the requirement time for GABA production and on the basis of the result of sensory tests.

(担当編集委員: 田中尚人)