

麹菌リアクターのスケールアップ試験と GABA 富化焼酎粕の機能性評価

土谷紀美*・松田茂樹*・石田彰男**・岩原正宜***

* 微生物応用部、** 熊本大学、*** 崇城大学

Scale-up test of reactor using *Aspergillus* mycelium and the Effect of *Shochu*-residue including GABA on Blood Pressure of SHR rat

Kimi TSUCHIYA*, Shigeki MATSUDA*, Akio ISHIDA** and Masayoshi IWAHARA***

これまでの研究により、食品工場由来バイオマスの有効利用を図るため、血圧調整作用を有する機能性成分として注目されるγ-アミノ酪酸(GABA)を麹菌によりバイオマス中のグルタミン酸から生産する製法を開発した。このシステムの実用化を目指したスケールアップ試験を行うとともに、得られた試料の高血圧抑制効果を評価するために、SHR(高血圧自然発症)ラットを用いた動物試験を行った。麹菌を用いた5L容のバイオリアクターシステムにおいて焼酎蒸留粕を用いた連続処理試験を行った結果、20時間連続反応後でも生産性は安定しており、リアクター出口で540mg/LのGABAを含む焼酎蒸留粕を得ることができた。GABA濃度は約7倍に富化され、200ml容の場合と同様の結果を得られたことから、GABA富化技術のスケールアップが可能であることが実証できた。SHRラットによる評価試験の結果、明らかな血圧上昇抑制作用が確認できたことから、機能性飲料としての用途開発が期待される。

1. はじめに

熊本県では、平成15年度から17年度にかけて都市エリア産学官連携促進事業において、「バイオマスの効率的処理技術の確立」について産学官による取り組みを行った。当センターでは分担テーマ「バイオマスからの生理活性物質の生産技術の開発」について研究を行った。

食品工場由来バイオマスの有効利用を図るため、血圧調整作用を有する機能性成分として注目されるγ-アミノ酪酸(GABA)をバイオマス中のグルタミン酸から生産する製法をこれまでに開発した^{1)~3)}。GABAは、非タンパク質性アミノ酸でヒトの場合脳や脊髄に局在し、血圧上昇抑制効果の他、脳機能改善効果、精神安定作用、中性脂肪抑制作用等様々な機能が確認されている^{4)~5)}。GABAは自然界には広く存在するものの微量であることから、上のような作用に必要な量を食事にとることは難しいとされ、GABA高含有食品の開発(胚芽米、緑茶、乳酸発酵品等)が活発に行われている^{6)~8)}。醸造業界で用いられ、安全性が認められている麹菌により、このGABAを生産するリアクターシステムについて、本事業ではスケールアップ試験を行い、実用化における問題点を抽出・解決するとともに、得られたGABA富化した試料の高血圧抑制効果を評価するために、ラットを用いた動物試験を行った。

2. 実験

2.1 バイオリアクターの試作とGABA生産システムのスケールアップ試験

反応槽が5Lのリアクターを試作した(図1)。

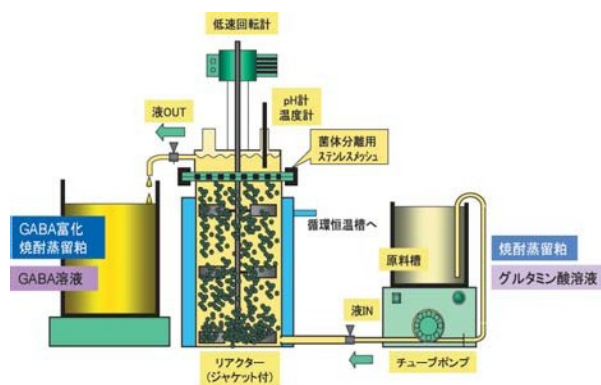


図1 麹菌リアクターの概略図

このリアクターを用いて、グルタミン酸を豊富に含む焼酎粕の通液試験、及び高濃度グルタミン酸溶液からのGABA生産試験を行い、0.2Lから5Lへのスケールアップ試験を行った。チューブポンプで原料槽から液状試料をリアクターに送液し、低速攪拌モーターによる攪拌ペラの回転でリアクター内で液と麹菌が混ざり合い、麹菌のグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD酵素)がグルタミン酸をGABAに変換する反応が起きる。リアクター内はジャケット槽の水を恒温水槽に循環させることで一定温度に制御されている。リアクター内の液体は押し出し式で連続運転が可能で、麹菌体は分離用ステンレスメッシュでリアクター内に留まっている。

焼酎粕は、球磨焼酎リサイクリン株式会社から供与された米製焼酎蒸留粕を膜処理装置(精密ろ過膜、0.2μm、旭化成株式会社)を用いて清澄化したものに、GAD酵素の補酵素であるピリドキサル5-リン酸

(pyridoxal-5-phosphate, PLP)を10 μ mol/Lになるように添加し、GAD酵素の最適pHである5.5に調整した焼酎蒸留粕を用いた。使用した麹菌は、*Aspergillus oryzae* (株) 菱六 SR-108, 味噌用麹菌)である。

液体培養によって得られたペレット状の麹菌体を0.9% NaCl 溶液で洗浄し、焼酎蒸留粕が入った5L 容リアクターに300g (湿重量)を投入した。焼酎蒸留粕は21mL/minの流速でペリスタポンプを用いて連続的にリアクターに供給し、処理液はオーバーフローにてリアクターから取り出した。リアクターにおける滞留時間は5時間、反応温度は37°Cに設定した。低速モーターにより20rpmにて攪拌しながら麹菌体と焼酎蒸留粕を反応させ5時間で焼酎蒸留粕17.1Lを通液した。

リアクター出口でサンプリングを行い、GABA の定量は、AccQ・Tag™法(Waters)により測定した。すなわち、50倍希釈した試料10 μ Lをホウ酸緩衝液70 μ Lで希釈し、AccQ・Flour 試薬20 μ Lを加え直ちに攪拌後、55°C、10分間加熱してGABAを蛍光誘導体化した。液体クロマトグラフ(Waters)によりGABA量を測定した。

2.2 GABA 富化焼酎粕の高血圧抑制効果の検証

グルタミン酸が豊富に含まれている焼酎粕をリアクター処理してGABAを富化し、その試料の高血圧抑制効果を評価するためSHR(高血圧自然発症)ラットを用いた動物試験を行った。試験に先立って、飼料に添加するためにGABA 富化焼酎粕の乾燥試験を行った。乾燥は凍結乾燥機(FD-5N, 東京理化工機(株))を使用し、乾燥助剤として乳糖、デキストリン、可溶性デンプンを用い、添加量を変えて検討した。

動物試験は、7週齢のラットを購入し、1週間予備飼育後、8週齢から15週齢まで、乾燥品を1%量通常飼料に添加した飼料を継続的に投与した。試験区は、A: 焼酎粕(リアクター未処理)、B:リアクター処理焼酎粕(GABA 富化焼酎粕)、C:グルタミン酸を添加した焼酎粕のリアクター処理液の3試験区及び、通常試料を与えるコントロール区を設定した。各試験区5匹で、飼料は自由摂取、1週間に一度血圧測定を行った(図2)。



図2 SHR ラットの血圧測定

3. 結果及び考察

3.1 バイオリアクターの試作・改良と GABA 生産システムのスケールアップ試験

試作したリアクター写真を図3に示す。今回、液漏れを防止するため菌体分離用ステンレスメッシュ部に改良を加えた。さらに攪拌効率をあげるため攪拌ペラの形状を改良、恒温反応のためジャケット部の改良を行った上で実証試験を行った。改良部を★で示す。



図3 麹菌バイオリアクター

リアクター出口における焼酎蒸留粕のGABA 濃度を測定した結果を図4に示した。リアクター処理前の焼酎蒸留粕には、GABAが75mg/L含まれていたが、20時間の連続反応後、焼酎蒸留粕中のGABA濃度は540mg/Lであった。300分滞留のリアクター処理によってGABA濃度は約7倍に富化され、小スケール時と同様の結果を得ることができた。

また、リアクター処理前後の焼酎粕に含まれる遊離アミノ酸を測定したところ、図5に示すとおり、リアクター処理後はグルタミン酸が減少し、GABAが増加していた。他の遊離アミノ酸の量に変化は見られず、焼酎粕中のグルタミン酸からGABAが生成されていることを確認できた。

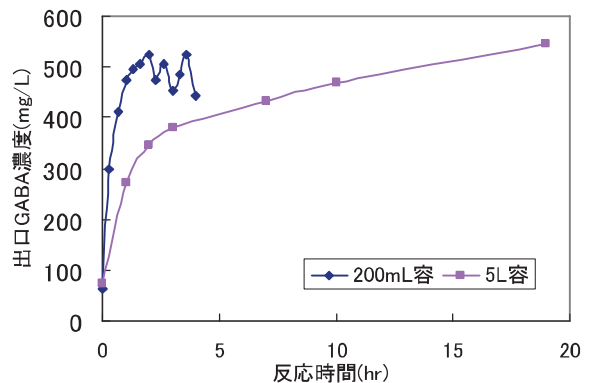


図4 バイオリアクター出口における GABA 濃度

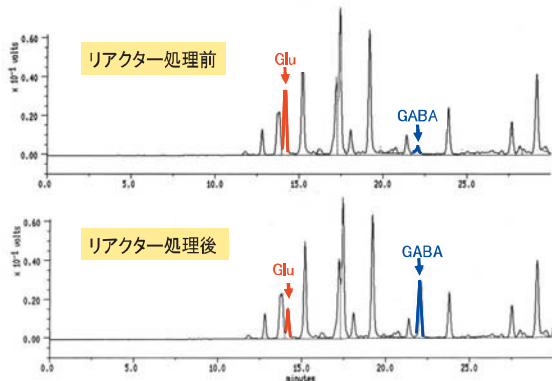


図5 リアクター処理前後のアミノ酸組成の変化

3.2 GABA 富化焼酎粕の高血圧抑制効果の検証

清澄化した状態の焼酎粕はそのまま乾燥しても吸湿が激しいため、乾燥助剤を用いた乾燥試験を行ったところ、低分子型デキストリン(サンデック#70、三和澱粉工業株式会社)を10%量添加することによって急激な吸湿を防止できることが分かった(表1)。リアクター処理したGABA富化焼酎粕の機能性を確認するためのラット飼料用に乾燥品を試作した工程を図6に示す。試験区A、B、C用にGABA濃度の異なる焼酎粕乾燥品をそれぞれ調製した結果、乾燥品中GABA含量は、A・B・C各々0.05、0.42、4.2g/100gであり、飼料中に1%添加して給餌を行った(表2)。

表1 リアクター処理焼酎粕の乾燥試験

	1%	5%	10%
乳糖	×	△	△
デキストリン	×	×	×
デキストリン(低分子型)	×	○	◎
可溶性デンプン(かんしょ)	×	×	×

◎:吸湿なし(サラサラ) ← → ×:吸湿有り(ベタベタ)

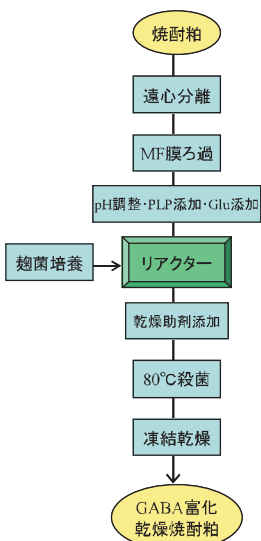


図6 GABA 富化焼酎乾燥品の製造フロー

表2 ラット試験用乾燥粉末中のGABA含量

	乾燥粉末中 GABA含量 (g/100g)	飼料中 GABA含量 (mg/100g)
A 焼酎粕(未処理)	0.05	0.5
B GABA富化焼酎粕	0.42	4.2
C GABA富化焼酎粕(GLU添加)	2.40	24.0

ラット給餌期間中の血圧の変動を図7に示した。給餌開始3週間目からコントロール群は血圧が上昇し始めたが、A区及びB区は8週間まで正常な血圧を維持しており、有意な血圧上昇抑制効果が確認できた。C区もコントロール群とは明らかに差が見られたが、A・B区よりもGABA濃度は高いものの逆に血圧低下の程度が小さい結果となった。

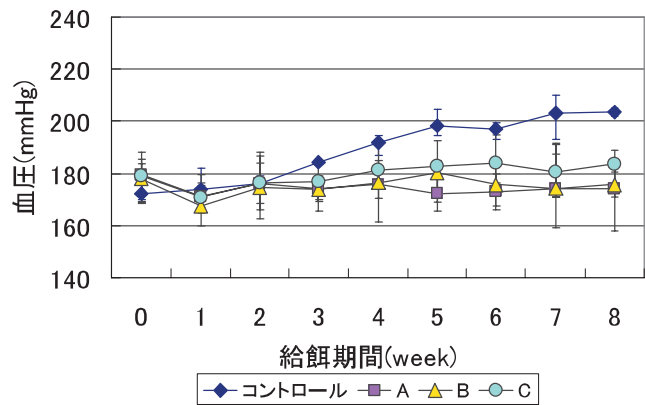


図7 GABA 富化焼酎粕の高血圧抑制効果

これまでのGABAに関する報告⁹⁾によると、ヒトに対しては1日GABA10mgの摂取で、有意な血圧調整効果を確認することができる。今回の試験結果からは、もともと焼酎粕に含まれるGABA濃度によっても血圧上昇抑制を確認することができたが、焼酎粕をモロミ酢飲料として液状で摂取する場合、1日10mgGABAを摂取するためには約160mL量と多量のモロミ酢を飲む必要がある。一方、GABA富化焼酎粕(B区)の場合は1日約20mL量でよく、手軽に摂取するには適量である。さらにC区の場合は3mLが適量となり、様々な清涼飲料水の一原料としての利用が可能である。

また、このような健康食品の場合は、過剰摂取による弊害も考慮しなければならないが、今回の動物試験では、効果が認められるよりもさらに50倍量の過剰なGABAを摂取しても過剰な血圧低下は認められず、安全な成分であるということも確認できた。

4. まとめ

本研究では、これまでに開発した麹菌を利用したリアクターによるGABA生産技術について、実用化を目的として5L容の試作機を製作し、その実証試験を行った。

米焼酎粕のリアクター処理試験を行ったところ、ラボスケールと同等のグルタミン酸からGABAへの変換率を得ることができた。食材化に代表される焼酎粕の高度利用化については、「もろみ酢」等の実例¹⁰⁾もあり、また、調味料の開発等^{11)~12)}がなされているところである。本研究では、焼酎粕に豊富に含まれるグルタミン酸に注目し、当成分からGABAを生産することにより、焼酎粕への機能性の付加が可能であることを示した。この機能性については、動物試験によりその効果を実証することができた。

謝辞

本研究は、当センターにおいて平成16~17年度に文部科学省の都市エリア産学官連携促進事業として実施したものです。本研究を遂行するにあたり貴重なご助言をいただいた(株)みなまた環境テクノセンター森下惟一氏に感謝いたします。また、ご協力をいただいた崇城大学研究員谷口智穂氏、実験においてご尽力いただいた崇城大学生物生命学部生、熊本大学教育学部生に感謝いたします。

文献

- 1) 土谷紀美, 西村賢了, 岩原正宜, 麹菌を用いた γ -アミノ酪酸(GABA)の生産と通電透析によるGABAの分離, 日本醸造協会誌, Vol. 97, pp878-882, 2002
- 2) 土谷紀美, 西村賢了, 岩原正宜, 麹菌リアクター処理による米及び麦焼酎粕の γ -アミノ酪酸富化, 日本醸造協会誌, Vol. 98, pp132-138, 2003
- 3) Tsuchiya K., Nishimura K., and Iwahara M., Purification and Characterization of Glutamate Decarboxylase from *Aspergillus oryzae*, *Food Sci. Technol. Res.*, Vol. 9, pp283-287, 2003
- 4) Stanton H.C., Mode of Action of Gamma Aminobutyric Acid on the Cardiovascular System. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, Vol. 143, pp195-204, 1963
- 5) 平野誠, 不安と脳内GABA, *臨床精神医学*, Vol. 21, pp575-584, 1992
- 6) Ohtsubo S., Asano S., Sato K. and Matsumoto I., Enzymatic Production of γ -Aminobutyric Acid Using Rice (*Oryza sativa*) Germ. *Food Sci. Technol. Res.*, Vol. 6,

pp208-211, 2000

- 7) 河野勇人, 姫野国夫, 紅麹の嫌気処理による γ -アミノ酪酸の蓄積, 日本醸造協会誌, Vol. 97, pp785-790, 2002
- 8) 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, 嫌気処理緑茶(ギャパロン茶)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, Vol. 61, pp1449-1451, 1987
- 9) 梶本修身, 平田洋, 西村明, GABA含有はっ酵乳製品の正常高値および軽症高血圧に対する長期摂取時の有効性と安全性, Vol. 6, 2003
- 10) 石川信夫, 沖縄の黒麹酢(もろみ酸), 日本醸造協会誌, Vol. 95, pp520-525, 2000
- 11) 横山定治, 垂水彰二, 乙類焼酎粕を利用した減塩調味料の生産及び性質, *生物工程*, Vol. 79, pp211-217, 2001
- 12) 立山陽子, 堤正博, 土谷紀美, 西村賢了, 焼酎蒸留液を利用した新規酒類及び調味料の開発, 第19回熊本県産学官技術交流会講演論文集, pp18-19, 2005