

茶抽出物中で γ -アミノ酪酸を生成する乳酸菌 *Lactobacillus brevis* mh4219の分離と それを用いた発酵茶飲料のストレス軽減効果

森 久子*・渡部 恭子・磯野 義員

(2007年10月19日受付 2007年11月19日受理)

Isolation of a Lactic Acid Bacterium, *Lactobacillus brevis* mh4219, Producing High Level of γ -Aminobutyric Acid (GABA) in Tea Extract and Stress Reducing Effect of Cultured Tea Beverage Containinig GABA

Hisako Mori*, Kyoko Watanabe, and Yoshikazu Isono (*Biwako Research Institute, Otsukafoods Co., Ltd., 1-11-1 Karasaki, Otsu, Shiga 520-0106*) Seibutsu-kogaku: **85**, 521-526, 2007.

A screening test was carried out to obtain a lactic acid bacteria that produced GABA in green tea extract, and strain mh4219 was isolated. This isolate converted 94.4% of glutamic acid to GABA even in a green tea extract containing 4.3 mg/ml of tannin. The isolate mh4219 was identified as *Lactobacillus brevis* from the partial base sequence of 16s rDNA, the mode of fermentation, and the phenotypic characteristics. A green tea beverage cultured with mh4219 was assayed for anti-stress action by a Krepelin's stress load test. The cultured green tea beverage alleviated subjective fatigue determined by POMS and subjective symptom tests in the healthy adult test groups. However, such stress markers present in saliva as chromogranin A and α -amylase did not show significant differences between the group who took the cultured tea beverage and the placebo group.

[**Key words:** γ -aminobutyric acid, GABA, *Lactobacillus brevis*, stress, tea]

γ -アミノ酪酸 (GABA) は生物界に広く存在する非タンパク性アミノ酸の一種であり、野菜、果物を始め各種の食品素材に含まれている。GABAは日常の食生活の中で摂取されている食品成分の一つであり、十分な食経験がある安全性の高い物質の一つと考えられている。動物においてGABAは抑制系の神経伝達物質として知られており、血管拡張、交感神経抑制などによる血圧低下 (上昇抑制) 作用¹⁻⁴⁾を有することが知られている。また、脳代謝促進作用があり、医薬品として頭部外傷性後遺症に伴う記憶障害、睡眠障害、頭痛、耳鳴りなどの諸症状を適応として用いられている⁵⁾。さらに精神安定作用⁶⁾、中性脂肪増加抑制作用⁷⁾、抗ストレス作用⁸⁾なども報告されている。このように有用な生理作用からGABAは機能性食品素材として注目されている。米を浸漬し、GABA含量を増大させたもの⁹⁾、トマト、ピーマンなどのグル

タミン酸脱水素酵素を利用し、GABAを蓄積させる方法¹⁰⁾、GABAを富化したクロレラ¹¹⁾などが報告されている。また、茶葉を嫌気処理することによってGABAを富化させた茶も知られている¹²⁾。微生物では紅麹にGABAが含まれることが知られており¹³⁾、血圧調製作用を目的とした食品素材として用いられている。また、乳酸菌の一部にも高濃度のGABAを生成するものが知られており¹⁴⁾、焼酎粕¹⁵⁾、米糠¹⁶⁾、乳³⁾などを発酵原料に、あるいは培地にグルタミン酸を添加することによって多量のGABAを生成させる方法が報告されている^{17,18)}。

一方、基石茶、阿波番茶などの乳酸発酵茶が一部の地域において伝統的に製造されている。これらに見いだされる乳酸菌は茶に含まれるカテキン類やタンニン酸に対して耐性のある *Lactobacillus plantarum* が主要な乳酸菌とされており¹⁹⁾、これらの製品はわずかな量のGABAを含

*連絡先 大塚食品株式会社琵琶湖研究所 (〒520-0106 滋賀県大津市唐崎 1-11-1)
TEL. 077-579-5980 FAX. 077-579-7096 E-mail: hmori@otsukafoods.co.jp

むに過ぎない。乳酸発酵茶は全国的にはあまり知られていないが、さわやかな酸味を有し、徳島県などでは一般的に飲用されている。今日、各種の茶系飲料が販売されているが、茶中で乳酸発酵を行うことにより官能的な特徴付けを行うとともにGABAを生成させることができれば、ストレス軽減作用などが期待できる新しい茶系飲料が開発できる。

そこで、本研究では茶抽出液中で生育しGABAを生成する乳酸菌の検索を行った。また、得られた乳酸菌を用い、乳酸発酵茶飲料を調製し、ストレス軽減効果についても検討した。

実験方法

GABAの測定法 培養液中のGABAは、薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。TLCの検体には培養上澄を用い、HPLCには、さらに限外ろ過 (東洋濾紙製ウルトラフィルターユニット USY-1) を行い用いた。TLCは Cellose F (Merck) を用い、n-butanol/acetic acid/H₂O (3/2/1, v/v) を展開溶媒として行った。発色試薬はニンヒドリンを用いた。HPLCによる測定は、逆相イオンペアクロマトグラフィー/ポストカラム誘導体化法により次のように行った；カラム：Shim-pack VP-ODS150 mml × 4.6 mm I.D. (島津製作所)、移動相：10 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウムを含む 20 mM リン酸バッファー (pH2.5)、流速：0.8 ml/min、反応試薬；OPA試薬キット (和光純薬製)、流速：0.4 ml/min、検出器：蛍光検出器 (Ex = 350 nm, Em = 450 nm)。

GABA生産乳酸菌のスクリーニング 発酵食品などから分離した乳酸菌 136 株について 1%グルタミン酸水素ナトリウム 1 水和物を含む MRS broth (Difco) で、30°C、48 時間培養し、TLC で GABA の生成が認められた菌株を選択した。次に GABA 生成が認められた菌株について 1%グルタミン酸水素ナトリウム 1 水和物を含む MRS broth (Difco) に茶抽出物を Brix 0.25% (タンニン含量 360 μ/ml) となるように添加した培地で 30°C、48 時間培養し、HPLC で GABA 生産量を測定した。

選抜した乳酸菌についての試験は、Brix 0.25% (タンニン含量 360 μ/ml) の茶抽出液 (通常の飲用レベル濃度) にグルコース 1%、酵母エキス 0.5%、大豆ペプチド SMP (不二製油) 1% を添加した培地を用いた。

乳酸菌の同定 培養前後のグルコースおよび乳酸をグルコース B テストワコー (和光純薬) と F-キット D-乳酸/L-乳酸 (Roche) 用い、定量することで乳酸発酵形式を判定し、アピ 50CH/50CHL (バイオメリュー社) を用い、糖の資化性を判定した。

16S ribosomal RNA 遺伝子 (16S rDNA) の塩基配列は、PCR により 5' 末端側約 500 bp の領域を増幅し、サイクルシーケンス法で決定した。PCR には MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification PCR kit (Applied Biosystems, CA, USA) を使用し、サイクルシーケンスには、MicroSeq500 16S rDNA bacterial identification sequencing kit (Applied Biosystems, CA, USA) を使用し Applied Biosystems 社のプロトコールに従って行った。得られた 16S rDNA の塩基配列を用いて MicroSeq bacterial 500 library V.0023 (Applied Biosystems, CA, USA) に対する相同検索を行い、さらに BLAST を用いて GenBank/DDBJ/EMBL) に対する相同検索を行った。

発酵茶飲料の抗ストレス作用 被検物は、mh4219 株で発酵した茶抽出液を主成分とし、香料などを加え、約 100 mg の GABA を含む物で Table 1 にその栄養成分を示す。なお、プラセボ飲料は未発酵の被検物と同じ茶抽出液を主成分とし、同じ香料などを加えたものを用いた。

試験は、16 名の健康な成人男女 (25–56 歳) を 2 群に分け、被検物またはプラセボ飲料 (100 g) を 1 本摂取させ、摂取後 45 分後に 15 分間の内田クレベリン検査 (株式会社日本・精神技術研究所) によるストレス負荷を行った。その後 15 分間安静にさせた。被検飲料 (あるいはプラセボ飲料) 摂取前、クレベリン検査によるストレス負荷直後、安静後の 3 回唾液を採取し、この唾液中のストレスマーカー (クロモグラニン A, α-アミラーゼ) を測定した。また同時に POMS 短縮版 (金子書房)、自覚症状しらべ (日本産業衛生学会産業疲労研究会, 2002 年) を用い、主観的疲労の調査をした。なお、試験は 1 週間の間隔を空けてクロスオーバーで実施した。被検者は体調不良、服薬中、通院治療中の者は除外し、試験開始 24 時間以内に GABA 添加飲食品を摂取せず、多量の飲酒をしていないことを条件とした。被検者には事前に試験の主旨を十分説明したうえで、本人の自由意志による試験参加への文書による同意を得た。試験結果については t 検定による有意差検定を行った。

唾液中のストレスマーカー測定法 唾液は Salivette

Table 1. Nutrient contents in cultured tea beverage.

Nutrients	Placebo / 100 g	Sample / 100 g
Energy	14 kcal	15 kcal
Protein	0 mg	0.2 g
Lipid	0 mg	0 mg
Carbohydrate	3.5 g	3.5 g
Theanine	2.8 mg	2.7 mg
GABA	1.1 mg	109.7 mg

(Sarstedt社製)を用い、被験者に脱脂綿を数分間咀嚼させることにより採取した。これを1000×gで2分間遠心し、その遠心上澄を唾液試料とした。α-アミラーゼの測定はそれぞれSalivary α-amylase assay kit (Salimerics社製)を用い行った。クロモグラニンAの測定はYK070 Human Chromogranin A EIA (矢内原研究所製)を用い測定を行った。クロモグラニンAの値については同時にProtein assay kit II (Bio-Rad Laboratories)を用い、タンパク含量を測定し、唾液中のタンパク質あたりの含有量で比較した。

実験結果および考察

GABA生産菌のスクリーニング, 同定 発酵食品などから分離した乳酸菌136株の中から緑茶抽出物中でも高いGABA生産能を示したmh4219株を選抜した。このmh4219株は、滋賀県で製造されたキムチより分離した

Table 2. Identification of strain mh4219.

	mh4219
Cell shape	Rod
Growth at 10 – 45°C	+
Gram staining	+
Catalase	-
Oxidase reaction	-
Fermentation type	Hetero
Lactic acid isomer	DL
Acid formation from	
L-Arabinose	+
Ribrose	+
D-Xylose	+
Galactose	+
Glucose	+
Fructose	+
Mannitol	w
α-Methyl-D-glucoside	+
N-Acetyl-glucosamine	w
Maltose	+
Melibiose	w
Gluconate	w
5-Keto-gluconate	w

The mh4219 did not produce any acid from glycerol, erythritol, D-arabinose, L-xylose, adonitol, β-methyl-D-xyloside, mannose, sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, sorbitol, α-methyl-D-mannoside, amigdalin, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, lactose, sucrose, trehalose, inulin, melezitose, raffinose, starch, glycogen, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, D-arabitol, L-arabitol, and 2-keto-gluconate. w, weakly positive.

```

1  TGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGGACGAAC GCTGGCGGCA TGCCTAATAC
51  ATGCAAGTCG AACGAGCTTC CGTTGAATGA CGTGCTTGCA CTGATTTCAA
101 CAATGAAGCG AGTGGCGAAC TGGTGAGTAA CACGTGGGGA ATCTGCCAG
151 AAGCAGGGGA TAACACTTGG AACAGGTGTC TAATACCGTA TAACAACAAA
201 ATCCGCATGG ATyTTGTTT AAAGGTGGCT TCGGCTATCA CTCTGGATG
251 ATCCCGCGGC GTATTAGTGA GTTGGTGAGG TAAAGGCCCA CCAAGACGAT
301 GATACGTAGC CGACCTGAGA GGGTAATCGG CCACATTGGG ACTGAGACAC
351 GGCCCAAACCT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC ACAATGGACG
401 AAAGTCTGAT GGAGCAATGC CGCGTGAGTG AAGAAGGGTT TCGGCTCGTA
451 AAACCTCTGT GTTAAAGAAG AACACCTTTG AGAGTAAGTG TTCAAGGGTT
501 GACGGTATTT AACGAGAAAG CCACGGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGGCG
551 TA

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of 16S rDNA of strain mh4219.

菌株である。

mh4219株の生化学的性質はTable 2のとおりである。mh4219株の16S rDNAの部分塩基配列 (Fig. 1) は、相対率99.5%で*Lactobacillus brevis*に最も高い相同性を示した。さらに乳酸発酵形式は、ヘテロでD/L乳酸を生成すること、アピ50CH/50CHLによる糖の資化性パターンから*L. brevis*と同定するのが妥当であると判断した。

各種GABA生産乳酸菌の茶中でのGABA生産量比較

茶抽出物中でのGABA生産能を他のGABA生産菌と比較するため、mh4219株とGABA生産乳酸菌をBrix3% (タンニン含量4.3 mg/ml) の茶抽出液にグルコース1%、酵母エキス0.5%、大豆ペプチドSMP1%を添加した培地 (pH5.85)、および茶抽出物を含まない培地 (グルコース1%、酵母エキス0.5%、大豆ペプチド1% (pH6.04)) で30°C、48時間培養した。

その結果、Table 3に示すように、mh4219株は茶抽出物中でもGABA生産能は低下しなかった。これに対して*Lactococcus lactis* FERM P-13646は、茶抽出物中では生育できず、他の菌株は生育したものの茶抽出物中ではGABA生産量が低下した。他の菌株は、生育はできるがポリフェノールによりグルタミン酸脱炭酸酵素の活性が抑制されたか、もしくはグルタミン酸脱炭酸酵素の生成系の一部が阻害されGABAへの変換率が低下したと考えられる。

GABA生産 (培養経過) mh4219株をBrix0.25%

(タンニン360 μ/ml) の茶抽出液にグルコース1%、酵母エキス0.5%、大豆ペプチドSMP1%、グルタミン酸ナトリウム1水和物5%を添加した培地で30°C、72時間培養し、乳酸菌数、pH、GABA含量、グルタミン酸含量を経時的に測定した。なお、グルタミン酸脱炭酸酵素の至適pHは5付近と考えられるが、発酵とともに脱炭酸反応によりpHが上昇するため、24時間後に50%クエン酸溶液を用いてpHを4.5に調整した。

mh4219株の菌数は、24時間で10⁹ CFU/mlに到達し、この付近から次第にグルタミン酸は減少しGABAが増加

Table 3. Production of GABA by lactic acid bacteria.

Strain	+ Tea extract			- Tea extract		
	Growth	GABA (mg / dl)	Conversion rate (%)	Growth	GABA (mg / dl)	Conversion rate (%)
<i>Lactobacillus brevis</i> mh4219	+	535	94.4	+	544	95.9
<i>Lactobacillus brevis</i> NBRC12005	+	32	5.6	+	537	94.7
<i>Lactobacillus brevis</i> OFC31	+	25	4.4	+	552	97.4
<i>Lactobacillus brevis</i> OFC34	+	0	0	+	178	31.3
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1149	+	0	0	+	7.7	1.4
<i>Lactococcus lactis</i> FERM P-13646	-	0	0	+	12.8	3.2

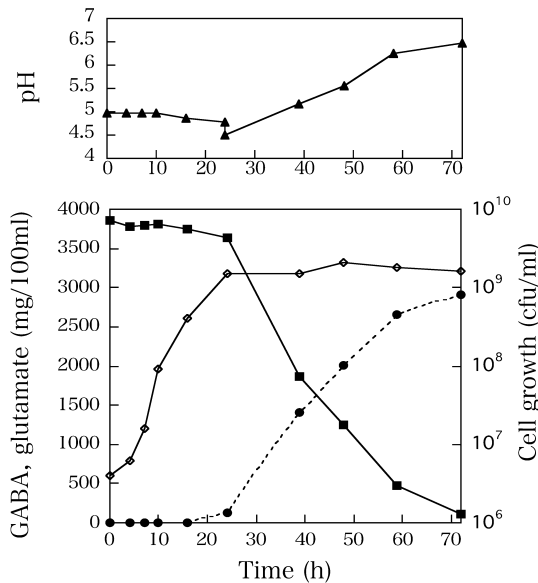


Fig. 2. Time course of GABA production by strain mh4219. The strain mh4219 was cultivated for 72h at 30°C in tea extract (Brix 0.25%, tannin content 360 μ g/ml, pH5.0) containing 1% glucose, 0.5% yeast extract, 1% soy peptide and 5% sodium hydrogen L(+) glutamate monohydrate. The pH of the medium was adjusted to 4.5 after 24h of cultivation by adding 50% citric acid sol. Symbols: ●, GABA; ■, glutamic acid; ◇, viable cells; ▲, pH.

していった。72 時間後にはグルタミン酸は、GABA へ 98.2%変換された (Fig. 2)。

同様にグルタミン酸水素ナトリウム 1 水和物 10%添加した場合でも 72 時間で変換率ほぼ 98.5%, 5.6 g/dl の GABA を産生した。本菌は茶抽出物中で GABA を産生するのみならず、その生産力価もこれまで報告されている GABA 産生乳酸菌^{16,17,20}と比較しても遜色ないレベルであると考えられた。

発酵茶飲料の抗ストレス効果検証試験結果

クレペリン検査によるストレス負荷試験を実施した時の主観的疲労感調査結果を Fig. 3 および Fig. 4 に示す。POMS 短縮版では被験物摂取群で TMD スコアの上昇が有意に抑制された。また、混乱 (confusion), 疲労 (fatigue), 怒り-敵意 (anger-hostility), 抑うつ-落込み (depression-dejection), 緊張-不安 (tention-anxiety) の各項目で検査後の数値の上昇, また活気 (vigor) の項目では数値の低下 (疲労感の上昇) が抑制される傾向が見られた。

また、自覚症状しらべにおいても合計点数, 不安定感 (unsettled feeling), ねむけ感 (drowsy feeling), 不快感 (unpleasant feeling), での数値の上昇を軽減する傾向が見られた。これらの結果から GABA を含む発酵茶飲料は

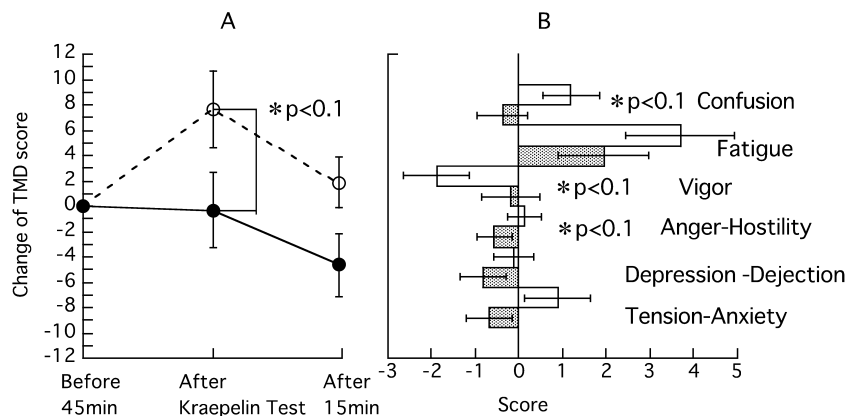


Fig. 3. Effect of cultured tea beverage measured by Uchida-kraepelin stress test with Profile of Mood states scores. (A) Change of TMD (total mood disturbance) score on Uchida-kraepelin test. Symbols: ●, cultured tea beverage; ○, placebo. (B) Difference of POMS score before and after Uchida-kraepelin test. Symbols: ■, cultured tea beverage; □, placebo.

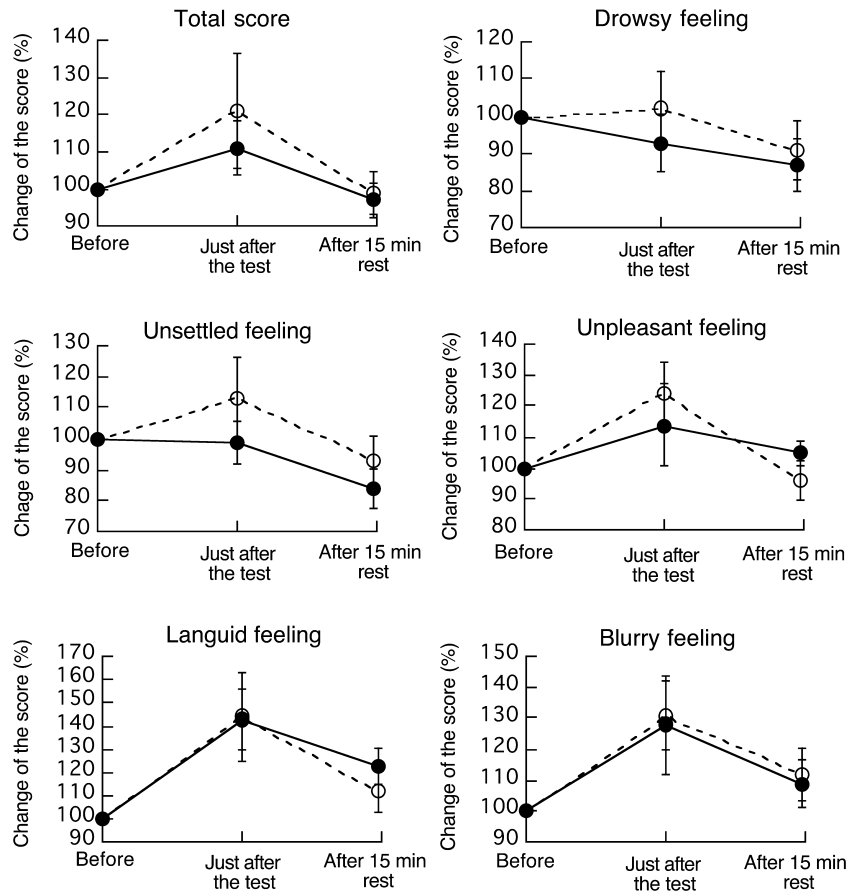


Fig. 4. Change of score of subjective symptom test. Symbols: ●, cultured tea beverage; ○, placebo.

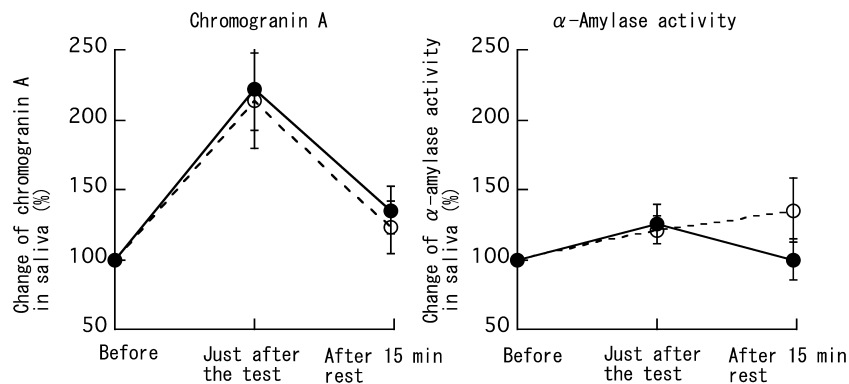


Fig. 5. Change of chromogranin A and α -amylase activity in saliva. Symbols: ●, cultured tea beverage; ○, placebo.

クレペリン検査によるストレス負荷に対し、主観的疲労感を軽減する作用があることが示唆された。

一方、唾液中のストレスマーカーであるクロモグラニンAおよび α -アミラーゼはFig. 5に示すように被験物摂取群、プラセボ群ともにストレス負荷によって上昇し、両群の間に顕著な差は見られなかった。

今回の試験において主観的疲労調査結果と唾液中のストレスマーカーであるクロモグラニンAおよび α -アミラーゼの結果は一致しなかった。唾液中のストレスマ-

ーカーとされる物質が直接イライラ感や不安感などの心的疲労状態を引き起こすとされているわけではなく、主観的疲労調査の結果と一致しないことは、ただちに矛盾した結果とは言えない。むしろ、唾液中のストレスマーカーが上昇することは生体の正常なストレス防御反応と考えられ、むやみにこれらを抑制せず、主観的疲労感を軽減できる方がむしろ好ましいかもしれない。しかしながら、GABAを用いた横越らの報告²¹⁾では主観的疲労感のみならず唾液中のストレスマーカーも抑制されており、今回

の試験結果と一致しない。横越らの試験ではあらかじめ心身的な疲労感を持つ人を被験者としており、このことが唾液中のストレスマーカーに対するGABAの影響に差が生じた可能性が考えられる。また、被験物中のGABA以外の成分の影響も考えられ、さらに詳しい検討が必要と思われる。

またクレペリン検査の正解率はGABA摂取群でやや高かったが、統計学的有意差は認められなかった。

mh4219株で発酵した茶は強い酸味を呈することもなく、官能的にも好ましいものであった。また、茶中でのGABA生産量は2-5%以上に達するため、あらかじめ発酵した茶を未発酵の茶やその他の原料で希釈することができ、発酵茶をベースにした各種の飲料の製造が可能と考えた。

また、今回の試験でmh4219株による発酵茶飲料はクレペリン検査によるストレス負荷に対して主観的疲労感を軽減する効果が示唆された。ストレスの多い現代社会において有用な作用であると考えられ、mh4219株による発酵茶はこのような機能を有する飲料への応用が期待できる。

要 約

茶抽出液中で生育し、GABAを産生する乳酸菌の検索を行い、mh4219株を分離した。本菌は、Brix 3%タンニン濃度 4.3 mg/ml の茶抽出液中でも グルタミン酸からの変換率94.4%でGABAを産生した。mh4219株は、16S rDNAの部分塩基配列、発酵形式、糖の資化性などから *Lactobacillus brevis* と同定した。mh4219株を用い発酵させた茶飲料についてクレペリン検査によるストレス負荷試験における抗ストレス作用を検討した。その結果、発酵茶飲料の飲用によってPOMSおよび自覚症状しらべにおける主観的疲労感を軽減させる作用が示唆された。しかし唾液中のストレスマーカーであるクロモグラニンAおよび α -アミラーゼについては差は認められなかった。

- 1) Santon, H. C.: *Arch. Int. Pharmacod.*, **143**, 195-204 (1963).
- 2) Takahashi, H., Tiba, M., Iino, M., and Takayasu, T.: *Jpn. J. Physiol.*, **5**, 334-339 (1955).
- 3) Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., and Sansawa, H.: *Eur. J. Clin. Nutr.*, **57**, 490-495 (2003).
- 4) 大森昭司, 矢野とし子, 岡本順子, 津志田藤次郎, 村井敏信, 樋口 満: 農化, **61**, 1449-1451 (1987).
- 5) 清水俊雄: 特定保健用食品の開発戦略, p.171, 日系BP社 (2004).
- 6) 岡田忠司, 杉下朋子, 村上太郎, 村井弘道, 三枝貴代, 堀野俊朗, 小野田明彦, 梶本修身, 高橋励, 高橋丈夫: 日食工誌, **47**, 596-603 (2000).
- 7) 堀江健二, 東口伸二, 横越英彦: *FOOD Style 21*, **8**, 64-68 (2004).
- 8) 堀江健二, 東口伸二, 横越英彦: *FOOD Style 21*, **7**, 64-68 (2003).
- 9) Saikusa, T., Horino, T., and Mori, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2291-2292 (1994).
- 10) 松本恭朗, 大野一仁, 別所康守, 平岡芳信: 愛媛県工業技術センター業績報告, **36**, 73-77 (1998).
- 11) 中村寿雄, 松林恒夫, 蒲池加寿子, 長谷川節, 安藤洋太, 大森正司: 農化, **74**, 907-909 (2000).
- 12) 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森昭司, 岡本淳子: 農化, **61**, 817-822 (1987).
- 13) 辻 啓介, 市川富夫, 田辺信和, 阿部士郎, 樽井庄一, 中川靖枝: 栄養学雑誌, **50**, 285-291 (1992).
- 14) 早川 潔, 上野義栄, 河村慎也, 谷口良三, 小田耕平: 生物工学, **75**, 239-244 (1997).
- 15) Yokoyama, S., Hiramatsu, J., and Hayakawa, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 95-97 (2002).
- 16) 大友理宣, 木村貴一, 渡辺誠衛, 戸枝一喜: 生物工学, **84**, 479-483 (2006).
- 17) 早川 潔, 上野義栄, 東口伸二, 金 武祚: 特開 2002-209552.
- 18) 桃井晋子, 戸田登志也, 奥平武則, 森下日出旗: 特開 2001-120179.
- 19) 岡田早苗: 日本乳酸菌学会誌, **13**, 23-35 (2002).
- 20) Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., and Kimura, T.: *Food Microbiology*, **22**, 497-504 (2003).
- 21) 横越英彦, 古都香織, 堀江健二, 中村研二, 中村桂子, 金平 努: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.267 (2007).