アブラナ科野菜の乳酸発酵によるγ−アミノ酪酸含量とアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害能の増強効果

法村奈保子*・小林元太[1)]・小松　豊[2)]・前田　稔[2)]・牧　哲義[3)]・園元謙二[4)]

福岡県特産の「三池高菜」等アブラナ科野菜から新しい食品素材を創出するため，アブラナ科野菜の品種を選定するとともに，野菜から分離した植物性乳酸菌でアブラナ科野菜を乳酸発酵し，その発酵液のγ−アミノ酪酸（GABA）含量およびアンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害能について検討した。

原料野菜としては，GABA およびグルタミン酸含量が多く，ACE 阻害能が高かった「三池高菜」,「かつお菜」,「山汐菜」の３品種を選定した。野菜より分離した植物性乳酸菌で「三池高菜」,「かつお菜」,「山汐菜」を乳酸発酵し，その発酵液の抗酸化性，GABA 含量および ACE 阻害能が高かった８菌株を選抜した。８菌株を同定した結果，*Lactobacillus brevis* が２菌株，*Enterococcus gallinarum* が２菌株，*Enterococcus Asseliflavus* が１菌株であった。

アブラナ科野菜を選定菌株で乳酸発酵すると，GABA 含量および ACE 阻害能が高い乳酸発酵液が得られた。これらの乳酸発酵液中の GABA は安定性が高く，30℃で４週間貯蔵しても減少しなかったことから，食品素材として有望であると考えられた。

［キーワード　アブラナ科野菜，植物性乳酸菌，γ−アミノ酪酸（GABA），アンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害能］

The Enhancing Effect of Gamma-amino Butyric Acid（GABA）Concentration and Angiotensin I-Converting Enzyme（ACE）Inhibitory Capacity in Varieties of *Brassica*

NORIMURA Naoko, Genta KOBAYASHI, Yutaka KOMATSU, Minoru MAEDA, Tetsuyoshi MAKI and Kenji SONOMOTO
（Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino Fukuoka 818-8549,Japan）*Bull.Fukuoka Agric.Res.Cent.* 28：11-16（2009）

In order to create a new vegetable foodstuff from varieties of Brassica, which are some of the specialty vegetables grown in Fukuoka Prefecture, these varieties were fermented with addition of botanical lactic acid bacteria. The fermentation liquids derived from the process were analyzed to determine the concentration of γ-aminobutyric acid（GABA）and angiotensin I-converting enzyme（ACE）inhibitory capacity.

'Miiketakana',Katsuona' and'Yamashiona,' are the varieties of Brassica that have been selected as candidates for the new foodstuff material, because these have been found to have high concentrations of GABA, glutamic acid and ACE inhibitory capacity. These varieties were fermented with lactic acid bacterium. As a result, eight strains proved to have high levels of antioxidative action, GABA concentration and ACE inhibitory capacity. These strains were identified to be two *Lactobacillus brevis,* two *Enterococcus gallinarum* and one *Enterococcus Asseliflavus.*

The high GABA concentration and ACE inhibitory capacity were obtained from the lactic acid fermentation. The GABA concentration of the fermentation liquid remained unaffected for four weeks at 30℃. Such findings appear to support these varieties to be promising as the new food material.

[Keywords: *Brassica*, plant origin lactic acid bacteria, Gamma-amino butyric acid（GABA）, Angiotensin I-converting enzyme（ACE）, inhibitory capacity]

緒　　言

アブラナ科野菜はカロテノイド類やビタミンＣなどが多く栄養性に優れており（渡辺ら 2002，法村・山下 2000），抗酸化性などの機能性が高いことが報告されている（前川ら 2006）。福岡県は「かつお菜」,「山汐菜」,「三池高菜」など地域特産のアブラナ科野菜の産地である。しかし，現在の用途は漬物がほとんどであり，今後これらの野菜の消費拡大を図るため，新たな加工利用方法の開発が求められている。

非タンパク性アミノ酸の一つであるγ−アミノ酪酸（以下 GABA とする）は，自然界に広く分布している。GABA は，生体内では抑制性の神経伝達物質であり，血圧降下作用，成長ホルモン分泌促進作用，リラックス作用，利尿作用等があると報告されている（茅野・杉浦 2001，榊原ら 2006，土田ら 2003，鵜澤ら 2002，渡辺　2005）。血圧降下作用については，GABA を 10mg ／100ml 含有する発酵乳100ml をヒトに12週間継続投与すると血圧が低下することが確認されている（三枝 1995）。

GABA は，乳酸菌が産生するグルタミン酸脱炭酸酵素によりグルタミン酸から生成されることが，早川ら 2004，榊原ら 2006，上野ら 2007により報告されている。乳酸菌では乳製品の発酵に関わる動物性乳酸菌がよく知られているが、自然界のさまざまな植物にも乳酸菌は存在しており，これらは植物性乳酸菌と言われている。動物性乳酸菌は，植物に含まれる成分により乳酸発酵が阻害されることがあり（岡田 2002），さらにラクトースや乳成分が無い環境では生育し難い。

＊連絡責任者（食品流通部：n-nori@farc.pref.fukuoka.jp）
１）佐賀大学有明海総合研究プロジェクト
２）㈱九州メディカル
３）一番食品㈱
４）九州大学大学院農学研究科

しかし，植物性乳酸菌はスクロースやフラクトースなどがあれば，植物を原料に乳酸発酵できる（長谷川ら 2004，中村ら 2003）。植物を原料に乳酸発酵を円滑に行うためには，原料となる植物に適した植物性乳酸菌を分離・選抜する必要がある。

GABA の血圧降下作用のメカニズムは，血管拡張作用，交感神経の亢進を抑えて血管の収縮に働く交感神経からのノルアドレナリン分泌抑制などとされている（渡辺 2005）。血圧を降下させる機構は他にもあり，その一つがアンジオテンシンⅠ変換酵素（以下 ACE とする）阻害能である。ACE は血圧調節に関わる酵素で、アンジオテンシンⅠをアンジオテンシンⅡに変換する。アンジオテンシンⅡは血管収縮に対して高い活性をもつため，これが増加すると血圧が上昇する。そこで ACE の働きを阻害すれば血圧の上昇を防ぐことができる（川岸 1996）。鈴木ら（1983）や三輪・吉村（1998）は「カラシナ」や「中島菜」に ACE 阻害能があることを報告している。

そこで，アブラナ科野菜の搾汁液を乳酸発酵することにより，GABA 等の機能性を増強するため，アブラナ科野菜の品種別に GABA やグルタミン酸含量と，ACE 阻害能を測定し，品種選定を行った。さらに，アブラナ科等の野菜から植物性乳酸菌を分離・選抜してアブラナ科野菜を乳酸発酵し，その発酵液について GABA 含量と ACE 阻害能の増強効果を明らかにした。また，乳酸発酵液中の GABA 安定性についても評価した。

試験方法

試験Ⅰ　アブラナ科野菜の品種比較

乳酸発酵の原料となる品種を選定するため，植物体における GABA やグルタミン酸などのアミノ酸含量および ACE 阻害能を比較した。

1　供試品種

福岡県産の「三池高菜」,「かつお菜」,「山汐菜」,「ぴりから菜」,「あぎおち菜」,「柳川高菜」,「晩抽青高菜」,「赤大葉高菜」,「大児菜」,「こぶ高菜」,「あざめ菜」を用いた。

2　アミノ酸（GABA およびグルタミン酸）の測定方法

それぞれの品種は，凍結乾燥後，粉末化し，－80℃に保存したものを供試した。粉末試料を80％エタノールで抽出し，抽出液を減圧濃縮した後，移動相に溶解してアミノ酸分析装置（島津製作所製）で測定した。

分析装置：ALC-1000
分析カラム：Shim-pack Amino-Na 型
（10cm×6.0mmID）
カラム温度：60℃
流量：0.4ml ／ min
移動相：アミノ酸分析移動相セット Na 型
反応試薬：アミノ酸分析キット OPA 試薬

3　ACE 阻害能の測定方法

ACE 阻害能は鈴木ら（1983）の方法に従い測定した。それぞれの品種の凍結乾燥粉末をリン酸緩衝液（pH8. 5）で抽出したものを試料とした。これに，ACE（和光純薬製，牛肺製）およびその基質である Hippryl-His-Leu（和光純薬製）を添加し，37℃で30分間反応後，o－フタルアルデヒド（OPA）試薬（和光純薬製）で発色させ，蛍光分光光度計（Ex：340nm，Em：455nm）で測定した。抽出液試料の代わりにリン酸緩衝液を試料として測定した ACE 活性を100として抽出液の ACE 活性を測定し，その値を100から差し引いた数値を阻害能として表した。

試験Ⅱ　野菜由来乳酸菌の分離・選定と乳酸発酵液の機能性評価

種々の野菜から植物性乳酸菌を分離した。分離した菌株でアブラナ科野菜を乳酸発酵し，その発酵液の抗酸化性，GABA 生成量および ACE 阻害能を比較した。さらに，機能性の高かった菌株について同定を行った。

1　植物性乳酸菌の分離方法

分離源となるかつお菜，キャベツ等の野菜を MRS 液体培地に浸し，30℃で２～３日間集積培養した培養液を炭酸カルシウム含有 MRS 平板培地上に接種し，30℃で２～３日間培養した。培養後にクリアゾーンを形成したコロニーを釣菌し，MRS 液体培地にて30℃で３日間培養して菌株を分離した。さらに，分離した菌株に３％過酸化水素水を滴下するカタラーゼ試験を行った。

2　乳酸発酵液の作製方法

原料となるアブラナ科野菜に同量の水を添加してホモジナイザーで磨砕し，分離した乳酸菌　を添加して30℃で72時間発酵し，乳酸発酵物を得た。これを遠心分離して得た上清を乳酸発酵液とした。

3　抗酸化性の評価方法

分離した植物性乳酸菌の乳酸発酵液について，須田ら（2000）の方法に従い DPPH ラジカル消去活性，津志田ら（1994）の方法に従い β－カロテン退色法で抗酸化性を評価した。対照菌株には，キャベツを乳酸発酵させた発酵液の抗酸化性が高い *Lactobacillus plantarum*　JCM1057を用いた。

4　GABA 生成量の分析方法

乳酸発酵液を蒸留水で10倍に希釈し、前出の方法と同様に GABA 含量を測定した。なお，各菌株の GABA 生成量は，培養後の GABA 濃度から培養前の GABA 濃度を差し引いた値を用い，さらに対照菌株を用いた乳酸発酵液の GABA 生成量を1.0とした時の相対値で表した。

5　ACE 阻害能の測定方法

乳酸発酵液をリン酸緩衝液（pH8.5）で10倍に希釈したものを試料とし，前出と同様の方法で測定した。

なお，各菌株の ACE 活性阻害能は，対照菌株を用いた乳酸発酵液の ACE 阻害能を1.0とした時の相対値で表した。

6　分離菌株の同定方法

機能性の高かった菌株について糖発酵性試験 API50 キットと16SrDNA シーケンス解析により分離菌株の同定を行った。

試験Ⅲ　GABA の安定性

1　pH および保存日数が GABA の安定性に及ぼす影響

pH3.0～8.0に調整した McIlvaine Buffer に GABA（和光純薬製）を溶解し，30℃で４週間貯蔵，経時的にサンプリングを行い，前出の方法と同様に GABA 含量を測定した。

2　乳酸発酵液中における GABA の安定性

「三池高菜」を sh 7 菌株（*Lactobacillus brevis*）で発酵した乳酸発酵液を121℃で10分間オートクレーブ滅菌した。その後30℃で４週間貯蔵し，経時的にサンプリングを行い，前出の方法と同様に GABA 含量を測定した。

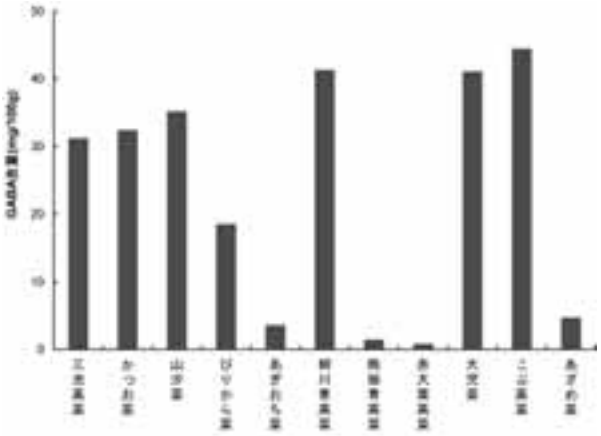
結果および考察

試験Ⅰ　アブラナ科野菜の品種比較

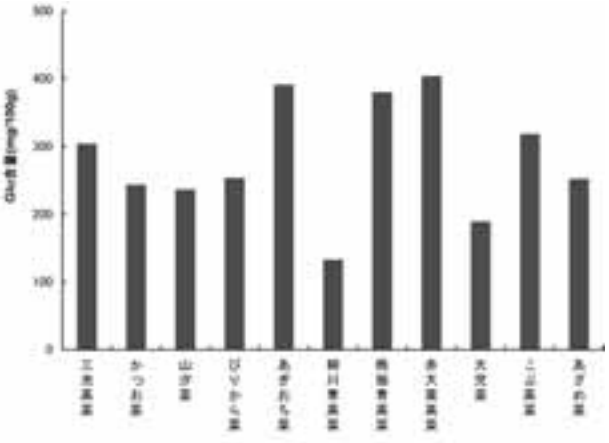
11品種のアブラナ科野菜の GABA 含量を第１図に示した。GABA は，「こぶ高菜」，「柳川青高菜」，「大児菜」，「山汐菜」，「かつお菜」，「三池高菜」で多かった。

また、GABA の前駆物質であるグルタミン酸含量を第２図に示した。グルタミン酸は，「赤大葉高菜」，「あぎおち菜」，「晩抽青高菜」，「こぶ高菜」，「三池高菜」で高い値を示した。

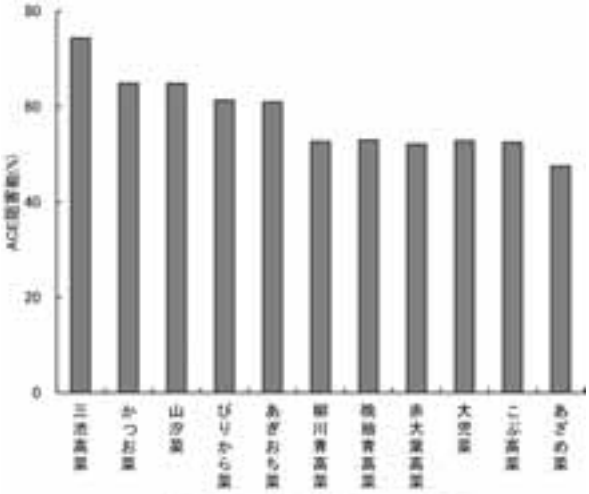
また，アブラナ科野菜抽出物の ACE 阻害能を測定し，第３図に示した。その結果，ACE 阻害能は，「三池高菜」，「かつお菜」，「山汐菜」，「ぴりから菜」，「あぎおち菜」で高かった。



第１図　アブラナ科野菜の GABA 含量



第２図　アブラナ科野菜のグルタミン酸含量



第３図　アブラナ科野菜の ACE 阻害能

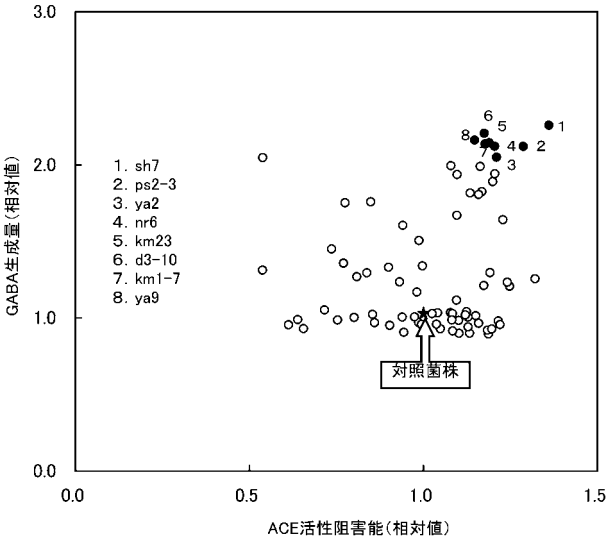
以上の結果より，ACE 阻害能が高く，GABA およびグルタミン酸の含量が多い，「三池高菜」，「かつお菜」，「山汐菜」の３品種を乳酸発酵原料として選定した。

試験Ⅱ　野菜由来乳酸菌の分離・選定と乳酸発酵液の機能性評価

炭酸カルシウム含有 MRS 培地上にクリアゾーンを形成し，過酸化水素によるカタラーゼ試験に陰性であった263菌株を植物性乳酸菌として分離した。本結果については，データ略とした。

野菜から分離した263菌株で「三池高菜」，「かつお菜」，「山汐菜」を乳酸発酵し，その発酵液の抗酸化性を測定した。その結果，263菌株の中で標準菌株より抗酸化性が高かったのは74菌株であった。本結果については，データ略とした。この74菌株で「三池高菜」，「かつお菜」，「山汐菜」を乳酸発酵した発酵液の GABA 生成量と ACE 阻害能を対照菌株と比較した結果を第４図に示した。GABA 生成量および ACE 阻害能がともに対照菌株より高かった sh7，ps2－3，ya2，nr6，km23，d3－10，km1－7，ya9の８菌株を選定した。選定した　８菌株による「三池高菜」，「かつお菜」，「山汐菜」の発酵液の GABA 含量を第５図に示した。発酵液の GABA 含量は34～41mg／100g であり，発芽玄米の15～20mg／100g（佐竹ら 2004）に比べると，高かった。また，早川ら（1994）は、野菜の乳酸発酵物であるキムチで0.3mg／g 以上，最大で5.8mg／g の GABA 含量が検出されたことを明らかにしている。キムチの製造には数ヶ月を要するが，本試験では72時間の乳酸発酵で約35mg／100g の GABA 含量を有する乳酸発酵液が得られた。すなわち，選抜した植物性乳酸菌を用いてアブラナ科野菜を乳酸発酵すると，短時間で GABA を富加した食品素材が得られることが明らかとなった。

また，同じく選定した８菌株による乳酸発酵液の ACE 阻害能を第６図に示した。その結果，分離した



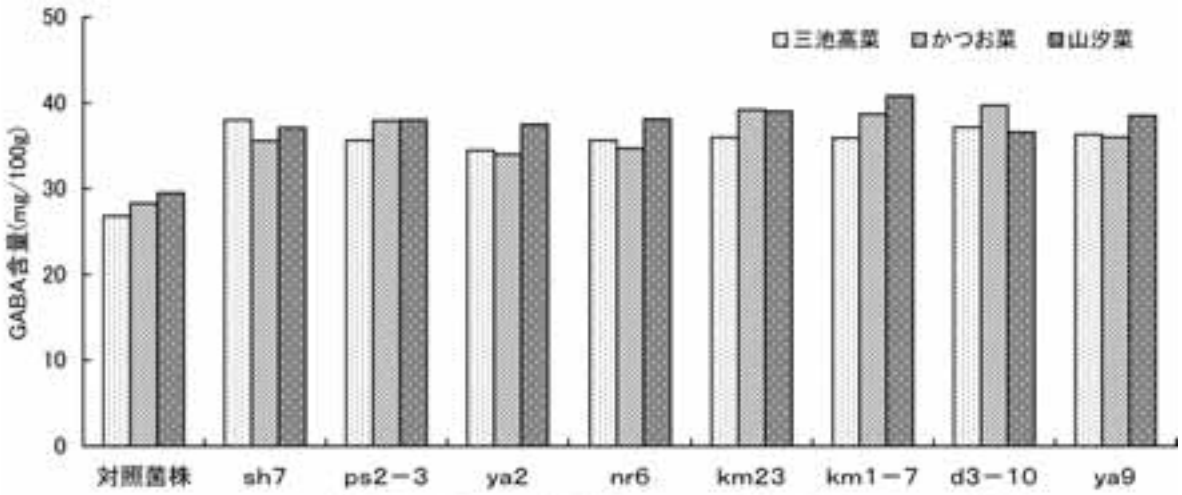
第４図　植物性乳酸菌（分離菌株）による乳酸発酵液の GABA 生成量と ACE 阻害能の分布
１）プロットは，3品種（三池高菜，かつお菜，山汐菜）の平均値を表す。

植物性乳酸菌の乳酸発酵液は，76～93％と高い ACE 阻害能を有していた。

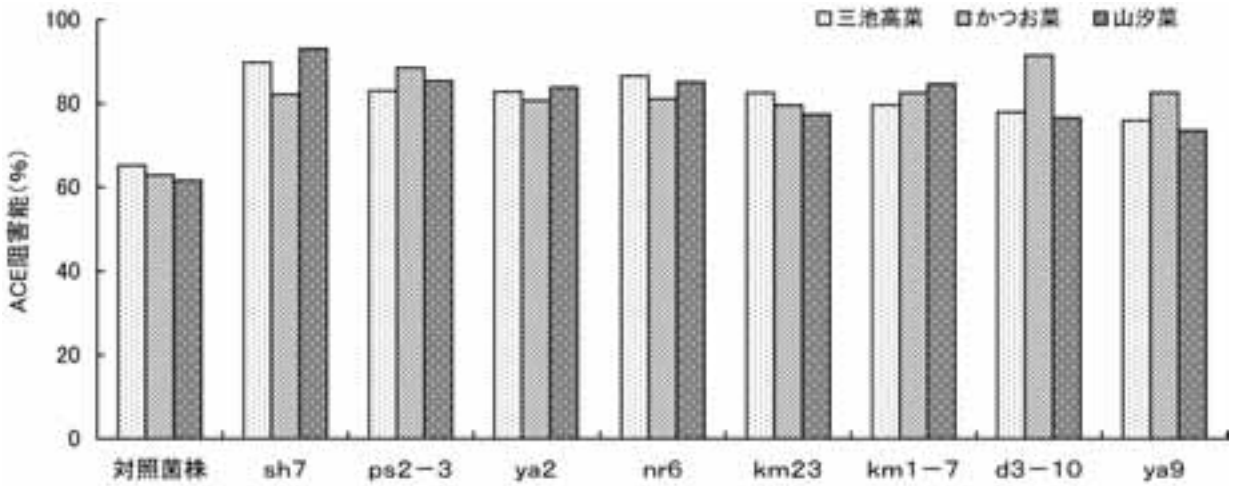
選定した菌株を同定した結果を第１表に示した。sh7と km1－7は *Lactobacillus brevis*，ps2－3と d3－10

第１表　分離・選定した菌株の同定

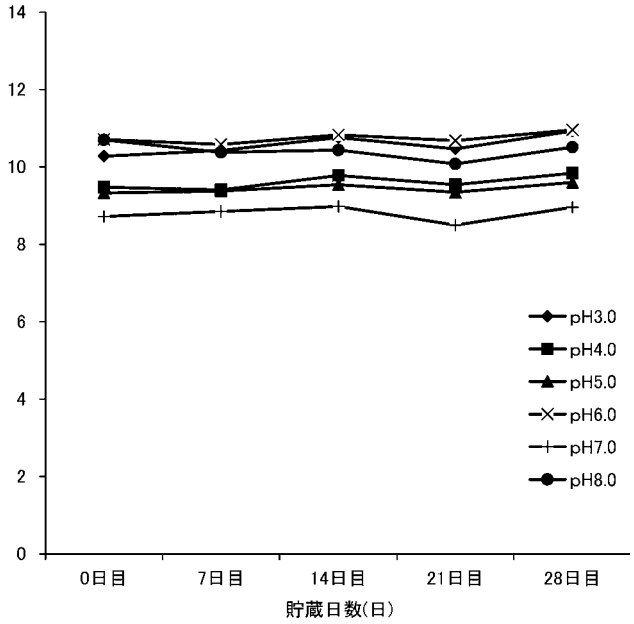
菌株	属・種
sh7	Lactobacillus brevis
ps2-3	Enterococcus gallinarum
ya2	Enterococcus asseliflavus
nr6	未同定
km23	未同定
km1-7	Lactobacillus brevis
d3-10	Enterococcus gallinarum
ya9	未同定



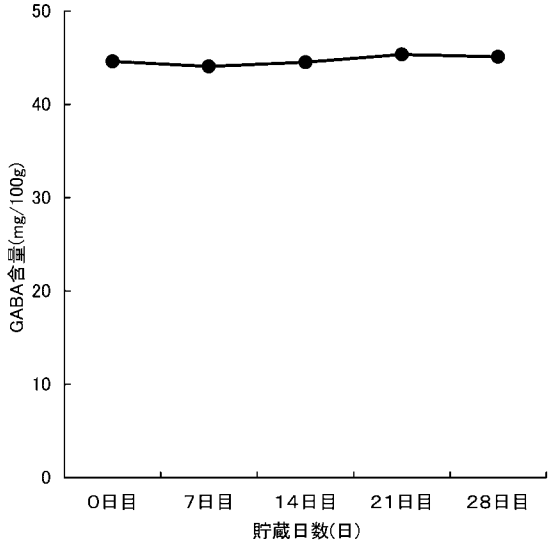
第５図　植物性乳酸菌（分離菌株）による乳酸発酵液の GABA 含量



第６図　植物性乳酸菌（分離菌株）による乳酸発酵液の ACE 阻害能



第７図　貯蔵中 GABA の安定性に及ぼす pH の影響



第８図　乳酸発酵液中の GABA の貯蔵安定性

は *Enterococcus gallinarum*，ya2は *Enterococcus sseliflavus* であることが明らかとなった。nr6，km23，ya9については，同定には至らなかった。

試験Ⅲ　GABA の安定性

pH が貯蔵中の GABA の安定性に及ぼす影響を第７図に示した。pH3.0～8.0の Mcllvaine　Buffer 中に溶解した GABA は，30℃で28日間貯蔵しても含量は減少しなかった。この結果より，GABA は pH の影響を受け難いため，乳酸発酵により pH が3.5～4.5に低下しても，GABA 含量には影響がないことが示唆された。

さらに，「三池高菜」の sh ７株乳酸発酵液について，貯蔵中の GABA 含量を第８図に示した。その結果，30℃で28日間貯蔵しても GABA 含量の低下は認められなかった。

以上のことから，「三池高菜」，「かつお菜」，「山汐菜」の３品種のアブラナ科野菜を原料にして，植物性乳酸菌 *Lactobacillus brevis*，*Enterococcus gallinarum*，*Enterococcus Asseliflavus* で乳酸発酵を行うと，GABA 含量と ACE 阻害能が増強された発酵液が得られる。さらに，発酵液中の GABA は安定性に優れていることから，新規食品素材として有望であると考えられる。

この研究は，平成14～17年度　財団法人福岡県科学技術振興財団（IST）の産学官共同研究開発事業で実施した。

引用文献

長谷川武夫・西本裕喜・林部昌弘・本田俊孝・渡邉恵介・村林甲介・福山篤司・渡邉剛士（2004）植物性乳酸菌による生理活性作用11：48－57.

早川潔・上野義栄・河村眞也・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（4）：239－244

茅野紘・杉浦友美（2001）近年の GABA 生理機能研究．食品と開発36（6）：４－6.

川岸舜朗（1996）　アンジオテンシン変換酵素阻害物質．　食品中の生体機能調節物質研究法，東京：学会出版センター，PP. 116－129.

前川健二郎・前田智雄・大島千周・鈴木卓・大澤勝次（2006）数種のアブラナ科スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化能に及ぼす照射強度の影響．園芸学研究５（3）：315－320.

三輪章志・吉村香奈子（1998）中島菜のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害能について．石川県農業総合研究センター研究報告21：45－51.

中村利恵・遠藤明仁・宮本真理・中島肇・内村泰・岡田早苗（2003）植物性乳酸菌の特性．日本生物工学会　平成15年度大会発表要旨：131

法村奈保子・山下純隆（2000）‘カツオ菜’葉身中の部位別内容成分組成．九州農業研究62：201.

岡田早苗（2002）植物性乳酸菌の世界とその秘める可能性．日本乳酸菌学会誌13（1）：23－35.　榊原正樹・吉川典孝・太郎田博之・稲福桂一郎・宮城健（2006）スピルリナの乳酸発酵によるγ－アミノ酪酸（GABA）の高含有化および血圧降下作用．DIC Technical　Review　12：13－19.

三枝貴代（1995）米胚芽中のγ－アミノ酪酸（GABA）を増やす　水浸漬により激増．高血圧治療食への応用に期待．化学と生物33：211－212.

佐竹利子・福森武・劉厚清・目崎孝昌・河野元信・佐々木泰弘・石渡健一（2004）高機能性米の調製加工技術の開発（3）．農業機械学会誌65（5）：117－124.

須田郁夫（2000）分光学的抗酸化機能評価．機能性研究法，東京：光琳，PP. 218－223.

鈴木建夫・石川宣子・目黒熙（1983）食品中のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害能について．日本農芸化学会誌57（11）：1143－1146.

土田隆・益子研土・山田勝彦・平塚秀雄・島田孝男・

板垣雪絵・藤沼秀光・鮫島浩二・中村寿雄・長谷川節・松林恒夫（2003）血圧が高めの健常者および軽症高血圧者に対するγ－アミノ酪酸高含有クロレラの効果．日本栄養・食糧学会誌56（2）：97－102.

津志田藤二郎（1994）各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定．日本食品科学工学会誌41（9）：611－618.

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（3）：109－114.

鵜澤昌好・奥山知子・村田真由美・佐藤良二・大森正司（2002）γ－アミノ酪酸高含有カボチャ加工品製造とそのラット血圧上昇抑制作用．日本食品科学工学会誌49（9）：573－582.

渡辺敏郎（2005）γ－アミノ酪酸（GABA：ギャバ）を含有する食品の開発とその機能性．New Food Industry 47（9）：8－12.

渡邉智子・土橋昇・進藤久美子・鈴木東子・安井明美（2002）山形みどり菜，タカナ（山形青菜）およびハクサイの部位別ビタミン含有率．日本食品保蔵科学28（6）：337－340.