

技術報告

GABA 非資化性パン酵母を利用した GABA 富化パンの製造

中村 敏英<sup>1\*</sup>, 安藤 聡<sup>2</sup>, 富田 理<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門  
〒 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

<sup>2</sup> 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門  
〒 514-2392 三重県津市安濃町草生 360

Production of bread rich in GABA using GABA non-assimilating baker's yeast

Toshihide Nakamura<sup>1\*</sup>, Akira Ando<sup>2</sup>, and Satoru Tomita<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Food Research Institute, NARO  
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

<sup>2</sup> Institute of Vegetable and Floriculture Science, NARO  
360 Kusawa, Anou, Tsu, Mie 514-2392, Japan

Abstract

$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) is typically consumed by yeasts during fermentation. To enrich GABA in bread dough, a yeast mutant defective in GABA-assimilation with a GABA-producing lactic acid bacterium (LAB) were used for dough fermentation. Bread dough prepared with the mutant yeast together with the LAB contained 1.7 and 2 times higher amount of GABA and total free amino acids, respectively, than that without LAB. The combined fermentation should be useful to bread making to enrich GABA in breads. Even when bread was made using rice flour rich in GABA, we confirmed that GABA-rich bread can be produced because the GABA non-assimilating baker's yeast hardly consumes GABA.

Key words:  $\gamma$ -aminobutyric acid, yeast, lactic acid bacteria, fermentation

$\gamma$ -アミノ酪酸, GABA 非資化性変異株, 乳酸菌, 発酵

---

中村と安藤は筆頭著者として同等に貢献した。

\* 連絡先 (Corresponding author), nakamrto@affrc.go.jp

## 緒言

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) はタンパク質を構成しないアミノ酸の一種で、哺乳類や両生類、爬虫類等の脳に大量に存在する物質として発見された<sup>1)</sup>。GABA は動物だけでなく植物や微生物にも見出され、生物界に広く存在していることが明らかとなっている。GABA は脳において抑制性の神経伝達物質として機能している<sup>2)</sup>。GABA にはリラックス効果の他、血圧上昇の抑制やインスリン分泌の促進などが報告されており<sup>2,4)</sup>、その保健効果を狙った GABA を多く含む食品が開発されている。GABA の富化については、茶葉の嫌氣的栽培や玄米の水浸漬などで成功している<sup>5),6)</sup>。また、細菌やカビ、酵母など微生物による GABA 生産も報告されている<sup>7-11)</sup>。発酵食品製造に関わる乳酸菌にも GABA を生産する菌株が存在することが報告されており、一般に乳酸菌はエネルギー獲得と環境の pH 上昇を目的として GABA を生産していると考えられている<sup>12),13)</sup>。

乳酸菌において GABA はグルタミン酸からの脱炭酸によって生成される。この反応を触媒する酵素はグルタミン酸脱炭酸酵素 (EC: 4.1.1.15) で、*Lactobacillus* 属や *Lactococcus* 属の一部の乳酸菌ではその精製が行われ、特性が明らかとなっている<sup>14),15)</sup>。乳酸菌の中でも比較的 GABA 生産量が多い *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 株は鮎ずしから分離され、酵素活性や遺伝子配列等の解析が行われた<sup>16),17)</sup>。*Lb. paracasei* NFRI 7415 株は最適な条件下では約 300 mM の GABA を生産することができる。

パン作りにはパン酵母以外にも乳酸菌が関わっており、その共生関係が明らかになりつつある<sup>18)</sup>。パン生地の発酵には程度の差はあるが乳酸菌が関わっていることが知られている<sup>19)</sup>が、特に乳酸菌を多く含むパン生地はサワー生地と呼ばれ、それを焼いたものがサワーブレッドとなる。サワーブレッドは欧米の伝統的発酵食品で、イタリアのパネトーネやドイツのザワーダイク、アメリカのサンフランシスコサワーなどが有名である。パン生地に含まれる乳酸菌は風味を良くするだけでなく、ライ麦などグルテンを含まない穀物でパンを作る際に生地を酸性化することで  $\alpha$ -アミラーゼの活性阻害、フィターゼの活性化、ペントサンの可溶性など生地の物性に大きく影響することが報告されている<sup>20)</sup>。また、サワー生地には乳酸菌が生産した GABA を含有するものもある<sup>21)</sup>。

サワーブレッドのように製パン時に GABA を生産

する乳酸菌を働かせることで GABA を富化したパンができると考えられるが、パン酵母が GABA を消費 (資化) してしまうという問題がある<sup>22)</sup>。そこで我々は GABA を資化しないパン酵母 (GABA 非資化性パン酵母) AY77 株を実用パン酵母の変異育種により分離し、その特性をこれまでに明らかにしている<sup>23),24)</sup>。AY77 株は窒素源代謝に関わる遺伝子発現を活性化する Dal81 の遺伝子に変異が入っており、GABA の取込や代謝に関わる遺伝子の発現が低下していることが明らかとなっている。

本研究では、パン生地中の GABA 含量を増強することを目的として、GABA 非資化性パン酵母と GABA 産生乳酸菌の複合発酵について検討した。また GABA 含量をより高めたパンを製造するために、GABA を多く含む米粉を利用した製パンについて検討した。

## 実験方法

### 1. 供試菌株および培地

本研究ではパン酵母として、実用株由来出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 二倍体株 AY13 株 (*MATa/a*) およびその GABA 非資化性変異株 AY77 株 (*MATa/a, dal81/dal81*) を使用した。また GABA 産生乳酸菌として鮎ずしから分離された *Lb. paracasei* NFRI 7415 株を使用した。

酵母の培養は YPD 培地 (10 g/L イーストエキス、20 g/L ラクト (Difco) 20 g/L ポリペプトン (Difco), 20 g/L グルコース) を使用し、30°C で 24 時間振盪した。糖蜜を使用した流加培養は Nishida ら<sup>25)</sup> の方法に従い行った。乳酸菌の培養は MRS 培地 (Difco) を使用し、30°C で 24 時間静置した。

### 2. パン酵母と乳酸菌の複合発酵

複合発酵に使用したパン生地の組成は、小麦粉 (カメリア、日清製粉) 100 g、グラニュー糖 5 g、塩化ナトリウム 2 g、圧搾酵母 2 g、逆浸透水 57 g、生理食塩水 (PBS) 10 mL で調製した。原料をすべて混ぜて 3 分間のミキシング後、30°C で 5 時間発酵を行った。乳酸菌を加える場合は、PBS に乳酸菌を懸濁 ( $8.8 \times 10^9$  cfu/mL) して加えた。発酵過程のガス発生量はファーマグラフ II (アトー) を用いて測定した。

### 3. 米粉パンの製造

米粉パンの製造には (株) 米ト産業の安藤年治氏より分譲された 412 nmol/g の GABA を含む GABA 富

化米粉（コシヒカリ，米ト産業）を使用した。米粉およびバイタルグルテン（A-グル GX，グリコ栄養食品）を8：2の配合で混合し，100 gの混合粉をパン生地作成に使用した。パン生地の組成は混合粉に対し5% グラニュー糖，2% 塩化ナトリウム，2% 圧搾酵母（市販生イーストもしくはAY77株を使用）で，加水量を68%で調製した。原料をすべて混ぜた後，3分間ミキシングを行い，30℃で1時間発酵を行った。ガス抜きを行った後，専用の型に入れてさらに30℃で1時間発酵を行い，200℃のオーブンで20分焼成した。

#### 4. 遊離アミノ酸の測定

発酵終了後のパン生地および焼成後のパンを凍結乾燥し，乳鉢と乳棒で粉末にした。0.2 gの粉末を75%エタノールに懸濁・攪拌した後，遠心分離を行い，上清を遠心エバポレーターで減圧乾固した。減圧乾固物を0.4 mLの滅菌水に溶解し，限外濾過（分画分子量30,000）を行い，濾液を回収した。50  $\mu$  Lの濾液をアミノ酸分析計JLC-500/V2（日本電子）に供し，遊離アミノ酸量の測定を行った。

### 実験結果

#### 1. パン酵母・乳酸菌複合発酵系によるパン生地発酵

GABA非資化性パン酵母AY77株およびGABA高生産乳酸菌*Lb. paracasei* NFRI 7415株を用いてパン生地発酵を行い，両株による複合発酵系の評価を行っ

た。まず，産業的パン酵母生産に用いられる流加培養法によってパン酵母を培養し，小麦粉に対して2%の菌体（圧搾酵母）を用いてパン生地を調製した。パン生地の発酵特性を調べた結果，AY77株は野生型パン酵母AY13株と同等な優れた発酵力を示した（図1A）。次に，パン生地発酵力に対する乳酸菌添加の影響を調べるため，MRS培地で培養した乳酸菌をPBSに懸濁してパン生地に添加し，その発酵特性を調べた。サワー生地を模して乳酸菌を $5 \times 10^8$  cfu/g生地重量となるようにパン生地に添加したところ，パン酵母株に関わらずガス発生量は乳酸菌無添加のパン生地とほとんど差が見られなかった（図1B）。パン酵母の発酵力への乳酸菌添加の影響は極めて低いことが明らかとなった。次に，複合発酵系におけるGABA等のアミノ酸の変動を明らかにするため，パン生地中の遊離アミノ酸の分析を行った（図2）。パン酵母単独での発酵の場合，AY13株を用いたパン生地ではGABAが全く検出されなかったが，AY77株を用いたパン生地では小麦粉に含まれる量とほぼ同等のGABAが検出された（図2A）。一方，AY77株と乳酸菌との複合発酵を行った場合，GABA含量が約1.7倍に増加することが明らかとなった。AY13株と乳酸菌との複合発酵においても少量のGABAが検出された。また，パン酵母株に関わらず，乳酸菌との複合発酵によって総遊離アミノ酸含量が顕著に増加していた（図2B）。以上の結果から，パン酵母・乳酸菌複合発酵系は，パン生地中のGABAやアミノ酸の増強に有効であることが明らかとなった。

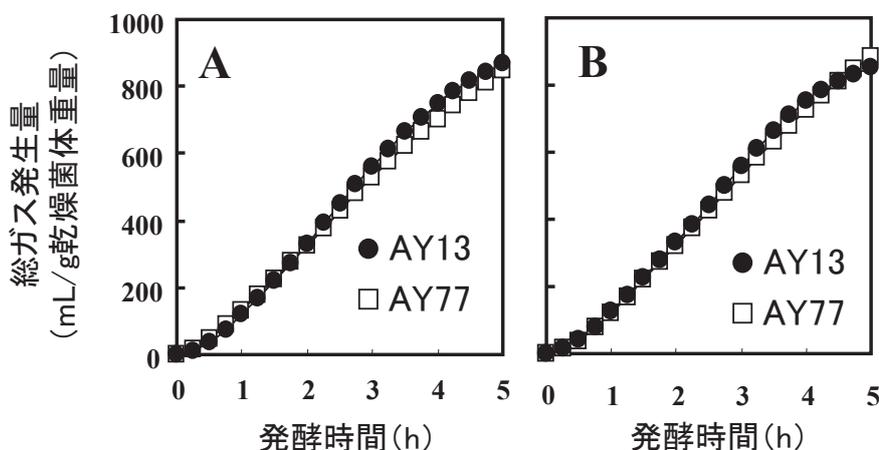


図1. パン生地発酵特性

パン生地発酵過程の総ガス発生量をファーモグラフⅡで測定した。データは3回の独立した実験の平均を示した。A：乳酸菌無添加，B：乳酸菌添加

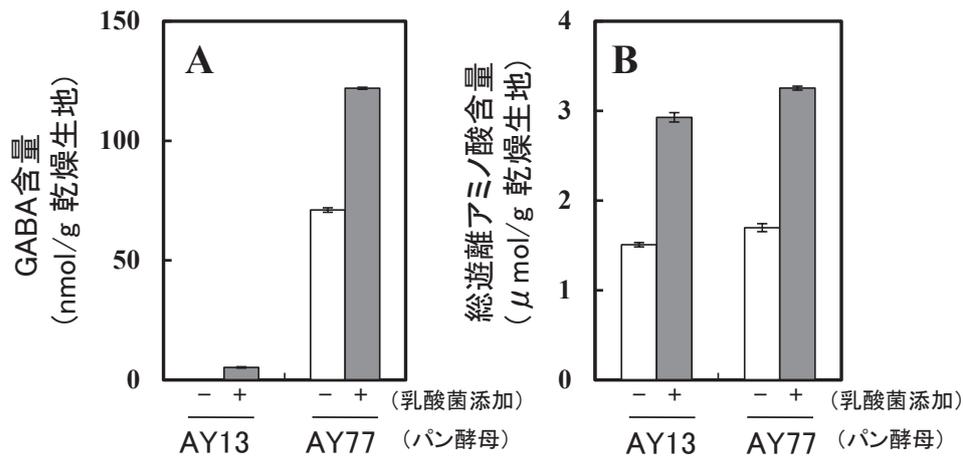


図2. パン生地中の遊離アミノ酸含量

発酵5時間後のパン生地から遊離アミノ酸を抽出し、アミノ酸分析を行った。データは3回の独立した実験の平均を示した。A：GABA含量，B：総遊離アミノ酸含量，-：乳酸菌無添加，+：乳酸菌添加

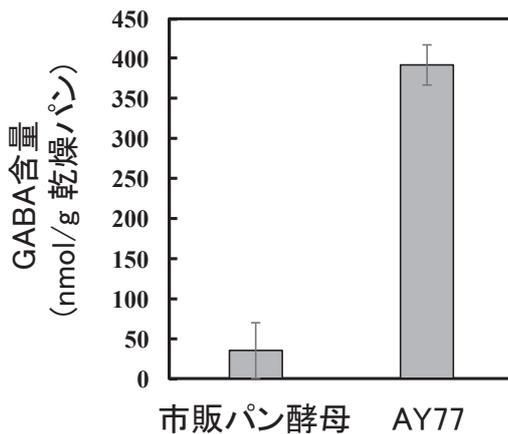


図3. 米粉パンのGABA含量

焼成後のパンから遊離アミノ酸を抽出し、アミノ酸分析によりGABAを定量した。データは2回の独立した実験でそれぞれ焼成パンの異なる2点の部位について測定した平均を示した。

## 2. GABA 富化米粉パンの製造

GABAの血圧降下の作用を期待するのであれば、1日に10 mg程度は摂取する必要がある<sup>26)</sup>。今回使用した小麦粉に含まれているGABAは75 nmol/g (7.7 mg/kg)であり、10 mgのGABAを摂取しようとすると小麦粉1.3 kg、食パンに換算すると約5斤食べなければならない。GABA高生産乳酸菌を使用してもGABA含量は不十分であると考えられた。そこでGABAをより多く含むパンを作るために、GABAを

多く含む米粉を利用してパンの製造を試みた。米粉とバイタルグルテンを用いたパン生地を作成し、市販パン酵母(生イースト)あるいはAY77株を使って発酵させた。パン生地をオーブンで焼いた後、できあがったパンに含まれるGABAを測定した結果、市販パン酵母を使用した米粉パンではGABAは36 nmol/g含まれており、十分の一程度にまで減少していた。一方、AY77株を使用した場合、393 nmol/gのGABAを含有し、小麦粉で作成したパンと比較して約6倍のGABAを含む米粉パンを製造することができた(図3)。このときGABAはほとんど減少していなかったことから、GABA濃度を高くしてもAY77株がGABAの取込や消費をほとんど行わないことが確認できた。

## 考察

本研究では、GABAを富化したパンの製造を目的として、パン酵母と乳酸菌の複合発酵およびGABA富化米粉を利用した製パンを行った。複合発酵においては乳酸菌によってGABAを増強できることが確認できた。パン類のGABA富化については、サワー生地にGABA高生産乳酸菌を添加することでGABAを増強した報告がある<sup>27)</sup>。サワー生地に含まれる酵母は通常のパン酵母(*S. cerevisiae*)と異なる種(*S. exiguus*, *Candida humilis*など)であるため、パン生地中でのGABAの代謝も異なっている可能性が考えられる。

パン酵母と乳酸菌の複合発酵において、栄養源の奪

い合いや pH の低下などによる発酵力の低下が懸念されたが、乳酸菌添加は発酵力にほとんど影響を与えなかった。バイオエタノール製造においては、乳酸菌の混入によって生産効率は大きく低下する<sup>28)</sup>。その一方で、サワー生地では酵母と乳酸菌は共生関係（相利共生）にあり、互いに栄養源を与え合っている<sup>18)</sup>。 *Lb. paracasei* はこれまでにサワー生地から分離されたことはないが、パン酵母と共生関係を築けている可能性があり、非常に興味深い。

今回、パン生地中の GABA を約 1.7 倍に増加させることができたが、発酵時間が 5 時間であることから製パン法としてはストレート法（直捏法）には不向きである。しかしながら、中種法における中種発酵には複合発酵が利用できると考えられる。乳酸菌の菌株や添加物、発酵温度などの条件を検討することで、発酵時間の短縮化や GABA のさらなる増強ができる可能性もあり、今後の検討課題である。

乳酸菌の添加により GABA だけでなく他の遊離アミノ酸の増加も観察された。一般的にパン生地中のアミノ酸はパン酵母によって資化されるため発酵時間に伴い減少するが、乳酸菌の働きでアミノ酸が供給されることでその減少幅が小さくなっていると推測された。アミノ酸はうまみなど風味に重要であることから、中種発酵のように長時間の発酵においては複合発酵が有効であると考えられる。

パンに含まれる GABA 量を実用に近いレベルまで向上させるために、GABA を多く含む米粉を利用してパンを製造した。GABA 非資化性パン酵母 AY77 株は、パン生地中の GABA 濃度が高くなってもほとんど消費しないことから実用性が高いと考えられる。しかしながら、本研究で作成した GABA 米粉パンでも食パン 1 斤程度食べないと保健効果が期待できない。本研究で使用した米粉は、粉に適宜加水の後に 63℃ で保温することで胚乳部分に GABA を蓄積させたものを原料としており、特許公報によると最大で今回使用した米の約 5 倍程度の GABA 蓄積が可能である<sup>29)</sup>。最大量の GABA を含む米粉を使用した食パンであれば 6 枚切りを 1 枚食べることで 10 mg の GABA を摂取でき、現実的である。

パンの主要な原料である小麦粉には、白米と同程度かそれ以下の量しか GABA が含まれていない。その GABA もパン生地発酵過程で消費されてしまうため、できあがったパンには GABA はほとんど含まれていない。本研究でも使用したが、白米では GABA を富化する技術が開発されている。小麦粉でも GABA を

富化する技術が開発されれば、GABA 富化パンなどから手軽に GABA の摂取ができるようになると期待される。

## 要約

一般的には、パン生地中の GABA はパン酵母によって資化されるため、できあがったパンには GABA はほとんど含まれていない。パンに含まれる GABA を富化するために、GABA 非資化性パン酵母と GABA 高生産乳酸菌を用いてパン生地の発酵を行った。パン酵母と乳酸菌との複合発酵によりパン生地中の GABA は約 1.7 倍、総遊離アミノ酸は約 2 倍に増加させることができた。パン酵母・乳酸菌複合発酵系は、パン生地中の GABA やアミノ酸の増強に有効である。また GABA を多く含む米粉を利用してパンを作った場合でも、GABA 非資化性パン酵母は GABA をほとんど消費しないため、GABA に富むパンの製造ができることが確認できた。

## 文献

- 1) Roberts, E., and Frankel, S. (1950).  $\gamma$ -Aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.*, **187**, 55-63.
- 2) Roberts, E., and Eidelberg, E. (1960). Metabolic and neurophysiological roles of gamma-aminobutyric acid. *Int. Rev. Neurobiol.*, **2**, 279-332.
- 3) Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., and Yamori, Y. (2004). Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br. J. Nutr.*, **92**, 411-417.
- 4) Adeghate, E., and Ponery, A. S. (2002) GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell*, **34**, 1-6.
- 5) Saikusa, T., Horino, T., and Mori, Y. (1994) Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2291-2292.
- 6) Tsushida, T., and Murai, T. (1987) Conversion of glutamic acid to  $\gamma$ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2865-2871.

- 7) Smith, D. K., Kassam, T., Singh, B., and Elliot, J. F. (1992) *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J. Bacteriol.*, **174**, 5820–5826.
- 8) Maras, B., Sweeney, G., Barra, D., Bossa, F., and John, R. A. (1992) The amino acid sequence of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 93–98.
- 9) Kono, I., and Himeno, K. (2000) Changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid content during beni-koji making. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 617–619.
- 10) Hao, R., and Schmit, J. C. (1993) Cloning of the gene for glutamate decarboxylase and its expression during conidiation in *Neurospora crassa*. *Biochem. J.*, **293**, 735–738.
- 11) Coleman, S. T., Fang, T. K., Rovinsky, S. A., Turano, F. J., and Moye-Rowley, W. S. (2001) Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 244–250.
- 12) Higuchi, T., Hayashi, H., and Abe, K. (1997) Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *J. Bacteriol.*, **179**, 3362–3364.
- 13) Small, P. L., and Waterman, S. R. (1998) Acid stress, anaerobiosis and *gadCB*: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.*, **6**, 214–216.
- 14) Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., and Oda, K. (1997) Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1168–1171.
- 15) Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y., Kobayashi, M., Kimoto, H., Suzuki, I., and Aso, H. (1999) *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology*, **145**, 1375–1380.
- 16) Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., and Kimura, T. (2005) Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.*, **22**, 497–504.
- 17) Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T., and Shima, J. (2008) Characterization of glutamate decarboxylase from a high gamma-aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **72**, 278–285.
- 18) Gobbetti, M., Corsetti, A., and Rossi, J. (1994) The sourdough microflora: Interactions between lactic acid bacteria and yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 275–279.
- 19) 岡田早苗 (1998) パン生地発酵と乳酸菌, 日本乳酸菌学会誌, **9**, 5-8.
- 20) de Vuyst, L., and Neysens, P. (2005) The sourdough microflora, biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.*, **16**, 43–56.
- 21) Nakamura, T., Yoshida, A., Komatsuzaki, N., Kawasumi, T., and Shima, J. (2007) Isolation and characterization of a low molecular weight peptide contained in sourdough, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 4871–4876.
- 22) Debarber, C. B., Prieto, J. A., and Collar, C. (1989) Reversed-phase high-performance liquid-chromatography analysis of changes in free amino-acids during wheat bread dough Fermentation. *Cereal Chem.*, **66**, 283–288.
- 23) 安藤聡, 森勝美, 島純 (2008)  $\gamma$ -アミノ酪酸非資化性パン酵母変異株の取得とその有用性 日本食品科学工学会誌, **55**, 32–36.
- 24) Ando, A., Nakamura, T. (2016) Prevention of GABA reduction during dough fermentation using a baker's yeast *dal81* mutant. *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 441–445.
- 25) Nishida, O., Kuwazaki, S., Suzuki, C., and Shima, J. (2004) Superior molasses assimilation, stress tolerance, and trehalose accumulation of baker's yeast isolated from dried sweet potatoes (hoshi-imo). *Biosci Biotechnol Biochem.*, **68**, 1442–1448.
- 26) 稗田螢火舞, 砂川陽一, 刀坂泰史, 長谷川浩二, 森本達也 (2015) 降圧効果を持つ機能性食品の薬理作用～血圧コントロールが期待される食品～日本薬理学雑誌, **146**, 33–39.
- 27) Bhanwar, S., Bamnia, M., Ghosh, M., and Ganguli, A. (2013) Use of *Lactococcus lactis* to enrich sourdough bread with  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Int J Food Sci Nutr.*, **64**, 77–81.
- 28) Skinner, K. A., and Leathers, T. D. (2004) Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 401–408.
- 29) 安藤年治, 安藤艶子 (2009) 栄養富化米製造方法. 特許第 4417433 号, 12月4日.