

発酵微生物が生産するγ-アミノ酪酸 (GABA) の定量方法の検討

バイオ系チーム 田中 秀典, 清野 珠美, 廣岡 青央, 和田 潤

要 旨

機能性アミノ酸であるγ-アミノ酪酸 (GABA) は自然界に広く存在し、乳酸菌や麹菌の中に顕著な量のGABAを生産する菌株がいることが知られている。今回、当研究所保有の乳酸菌ライブラリーを対象としたスクリーニング及び食品中のGABA含有量測定を行うため、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いたGABAの簡易的な検出と、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いた定量方法について検討した。TLCでは展開溶媒に酢酸-酢酸エチル-メタノール-水系を用いることで、LC-MSではサンプルの調製液と溶出溶媒にギ酸を添加することで、様々な夾雑物が含まれる乳酸菌培養液上清サンプルにおいてGABAの分離検出と定量解析が行えた。更に、研究所独自の多成分分析方法構築を目指して、GABAと有機酸の一斉分析方法を検討したところ、単一の分析条件で一斉分析が可能であることが分かった。

1. 緒言

γ-アミノ酪酸 (GABA) は動植物、微生物に広く分布する非タンパク質構成アミノ酸の一種であり、動物の生体内においては抑制性神経伝達物質として作用する¹⁾。さらに、血圧降下作用²⁾ やストレス低減作用³⁾ などの生理活性機能を有する機能性アミノ酸としても注目を集めており、近年菓子やサプリメントを始め、漬物や清酒といった発酵食品においても、GABAを多く含む商品が多数開発されている。GABAは生体内においてグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) のはたらきによってグルタミン酸から脱炭酸が起こり生産される物質であり (図1)、発酵微生物である乳酸菌や酵母、麹もGADを有していることが判っている⁴⁻⁶⁾。乳酸菌や麹菌の中には顕著な量のGABAを生産・蓄積する菌株がいることが報告されている^{7, 8)} 一方、酵母はGABAを生産するものの、窒素源として資化するために清酒やパンに含まれるGABAは減少してしまう^{8, 9)}。GABAを高含有する発酵食品を製造するには、GABA高生産菌株を用いた発酵、GABA非資化性菌株を用いた発酵、基質となるグルタミ

ン酸 (又はグルタミン酸ナトリウム) を添加した発酵などが求められる。GABA高生産菌株とGABA非資化性菌株の開発・評価及び発酵食品中のGABA含有量の評価には、複数の成分が混在する多数の試料中のGABAを測定することに加え、同時に食品の風味に影響を与える有機酸などの成分も測定することが求められる。

昨今は計測装置や解析ソフトの高性能化によって多量のデータ処理が可能となり、研究の方針の仮説駆動型からデータ駆動型への移行も多くみられる。比較解析やメカニズムの解明及び、ノンターゲットでのスクリーニングを短時間で効率的に行うには、同一装置構成や溶媒条件で多数の成分を一斉に分析できることが求められる。

GABAの定量方法として一般的には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた分析が行われるが、GABAを含むアミノ酸の大部分はそのままでは紫外可視分光検出器や蛍光検出器で検出できないため、ポストカラム誘導体化法を用いて検出する必要がある。ニンヒドリン試薬を用いる誘導体化法は古典的な方法であるが、反応温度の高さや反応時間の長さ、検出感度の低さなどのデ

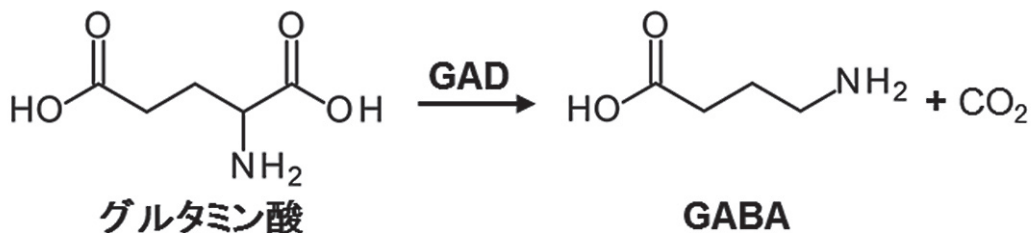


図1 グルタミン酸からGABAへの生合成

メリットが存在し、オルトフタルアルデヒド試薬を用いた誘導体化は室温でも起こり、検出感度も高いものの、誘導体化物の不安定さがデメリットである。また、装置が安価で分解能も高いガスクロマトグラフィー (GC) による分析方法は前処理が煩雑であり、酵素法による分析は紫外可視分光光度計などで簡便に測定できるが、一度に一成分しか測定できない。

一方で、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) は、成分を分離後にイオン化して質量電荷比 (m/z) を検出するため、装置は高価なもの、誘導体化を行うことなく高感度な一斉分析が可能である¹⁰⁾。そこで、研究所保有乳酸菌ライブラリーを対象としたGABA高生産菌株のスクリーニング及び食品中のGABA含有量の測定を行うため、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた30分以内に同時に複数のサンプルの評価ができる簡易評価方法と、LC-MSを用いた定量分析法を検討した。定量分析においては、種々の機能性成分や代謝成分の一斉分析を可能にするメソッドの構築を目指して、本研究で新たに測定の対象としたGABAと前報の有機酸の同時分析も試みたので報告する。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

有用物質生産菌株として独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) から購入した *Levilactobacillus brevis* NBRC12005株 (GABA生産菌株⁷⁾) 及び *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC12007株 (Nisin生産菌株¹¹⁾) を用いた。

2.2 乳酸菌の培養方法

乳酸菌はMRS培地 (Difco) を用いて3日間30℃で静置培養した。

2.3 GABAの簡易評価方法

GABAの簡易評価は薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた定性分析により行った。分析条件を表1に示す。

表1 TLC分析条件

薄層プレート	TLCアルミシート シリカゲル60 F254 (Merck)
展開溶媒	酢酸エチル：酢酸：メタノール：水 =12：3：3：2 (v/v/v/v)
発色試薬	ニンヒドリン：酢酸：エタノール =0.3：3：100 (w/v/v)

2.4 GABAの定量分析

2.4.1 検量線用標準溶液の調製

GABA溶液はGABAを蒸留水に溶解させて1,000 ppm溶液を調製し、4℃で保存した。使用時にギ酸 (終濃度1%) を用いて希釈し、0.1, 0.5, 1, 5, 10 ppmの標準GABA溶液をそれぞれ調製し、分析に供した。

また、必要に応じて、酒石酸、リンゴ酸、ピルビン酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸及びメチルコハク酸との混合溶液を調製して分析に供した。

2.4.2 乳酸菌培養液上清試料の調製

培養液を遠心分離して得た培養液上清を1%ギ酸で100倍に希釈し、0.45 µmのフィルターによりろ過したものを分析に供した。

2.4.3 定量分析条件

GABAの定量分析はLC-MSにより行った。分析装置、分析条件は、前報の有機酸分析法¹²⁾ に準じて行った。ただし、MS検出はPositiveモードで行った。分析条件を表2に示す。

乳酸菌培養液上清試料中のGABAの定量は、標準GABA溶液のピーク面積から求めた検量線を基に算出した。

表2 LC-MS分析条件

LC条件	
カラム	Discovery HS F5カラム (100×4.6 mm, 5 µm, Supelco)
カラム温度	40℃
流速	0.3 mL/min
移動相A	0.1%ギ酸
移動相B	0.1%ギ酸-80%アセトニトリル
溶出グラジエント	0-10 min B 0-55% 10-20 min B 100% 20-40 min B 0%
注入量	5 µL
MS条件	
イオン化	ESI, Positive, MRMモード
MRMトランジション	104.13 > 86.90

3. 結果と考察

3.1 GABA生産菌株の簡易評価方法

L. brevis NBRC12005株及び *L. lactis* NBRC12007株を

MRS培地で3日間培養し、培養液上清を得た。GABAの生産を簡易的に確認するために、TLCによる分析を検討した。展開溶媒についてクロロホルム-メタノール-水系、1-プロパノール-水系及び酢酸-酢酸エチル-メタノール-水系で検討した結果、その内、酢酸-酢酸エチル-メタノール-水系において、培養液上清中に存在する他の成分と移動度が異なってGABAの良好な分離が確認できた(図2)。GABA生産菌株として用いた*L. brevis* NBRC12005株において、GABAの展開位置に濃いスポットが検出された。

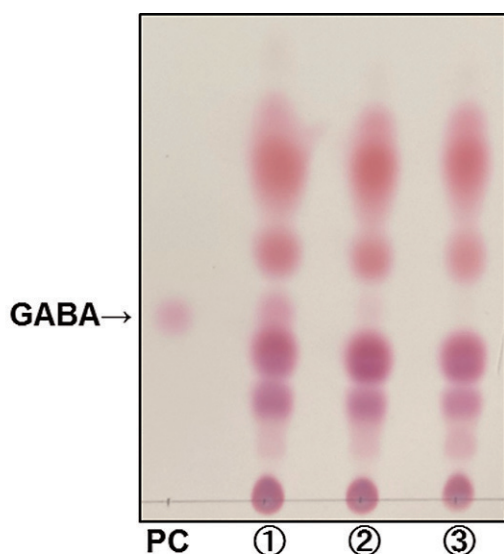


図2 培養液上清のTLC像
PC: Positive Control, ①: NBRC12005,
②: NBRC12007, ③: MRS培地

3.2 標準GABA溶液の検量線の作成

LC-MSシステムによるGABAのMRMトランジションの決定には、10 ppmのGABA標準溶液とMasslynxソフトウェアのIntelliStart機能を用いた。前報の有機酸分析において、展開溶媒のみならずサンプル調製液にもギ酸を添加することにより、サンプルの安定した検出が可能となったため、研究所独自の多成分一斉分析メソッド構築を見据えてGABAの分析においてもギ酸添加した溶液によるサンプル調製を行った。結果、Discovery HS F5カラムとLC-MSシステムを用いることで、GABAの理想的なピーク形状のクロマトグラムを検出できた(図3)。0.1-10 ppmの標準溶液のピーク面積を基に検量線を作成したところ、0.1-10 ppmの範囲で0.995以上、0.1-5 ppmで0.999以上の決定係数(相関係数の2乗, r^2)を得られた。したがって、これらの濃

度範囲において、GABAは直線性の高い検量線作成と精密な定量分析が可能であることが示された。

また、GABAを含む多成分一斉分析メソッド構築のために有機酸9種類(酒石酸、リンゴ酸、ピルビン酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸及びメチルコハク酸)の検出パラメータと混合した検出メソッドを作成した。分離溶媒を検討した結果、両移動相ともにギ酸を添加した水-アセトニトリル系を用いた。更に、移動相Bのアセトニトリルを80%として有機酸の良好な分離が確認されたグラジエントを採用し(表2)、10成分混合溶液を同様の条件で分析したところ、各成分に干渉することなく全成分を分離検出できた(図4)。したがって、Discovery HS F5カラムを用いて溶媒や分離条件を変えることなく、GABAの検出にPositiveモードを、有機酸の検出にNegativeモードを用いて効率的に一斉分析が可能であることが示された。

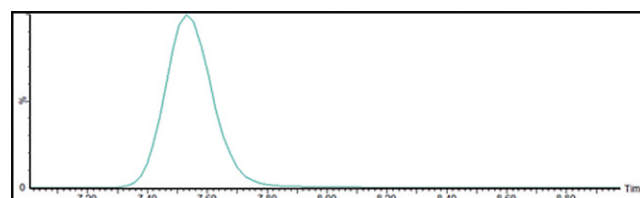


図3 GABAのマスクロマトグラム

3.3 乳酸菌サンプルの定量分析

GABA生産菌株の簡易評価方法の検討と同様に、*L. brevis* NBRC12005株及び*L. lactis* NBRC12007株をMRS培地で3日間培養し、培養液上清を得た。

次に、培養液上清のGABA濃度をLC-MSにより定量分析した。培養液上清サンプルにおいても標準溶液のGABAと同じ保持時間(7.5 min)及びMRMトランジションにピークを検出できたため、アミノ酸やタンパク質、糖、脂質、有機酸、核酸などの様々な物質が含まれている中から、GABAのみを分離検出できたと考えられる(図5 A)。一方で培養液中の種々の有機酸についても、それぞれ標準溶液と同様の保持時間及びMRMトランジションを有するピークを検出でき、GABAと同時に分析することができた。定量解析の結果、既知のGABA高生産菌株である*L. brevis* NBRC12005株は約570 ppmのGABAを、Nisin(抗菌性物質)高生産菌株である*L. lactis* NBRC12007株は約100 ppmのGABAを生産していた(図5 B)。その他の有機酸については表3の通りに生産又は分解していた。

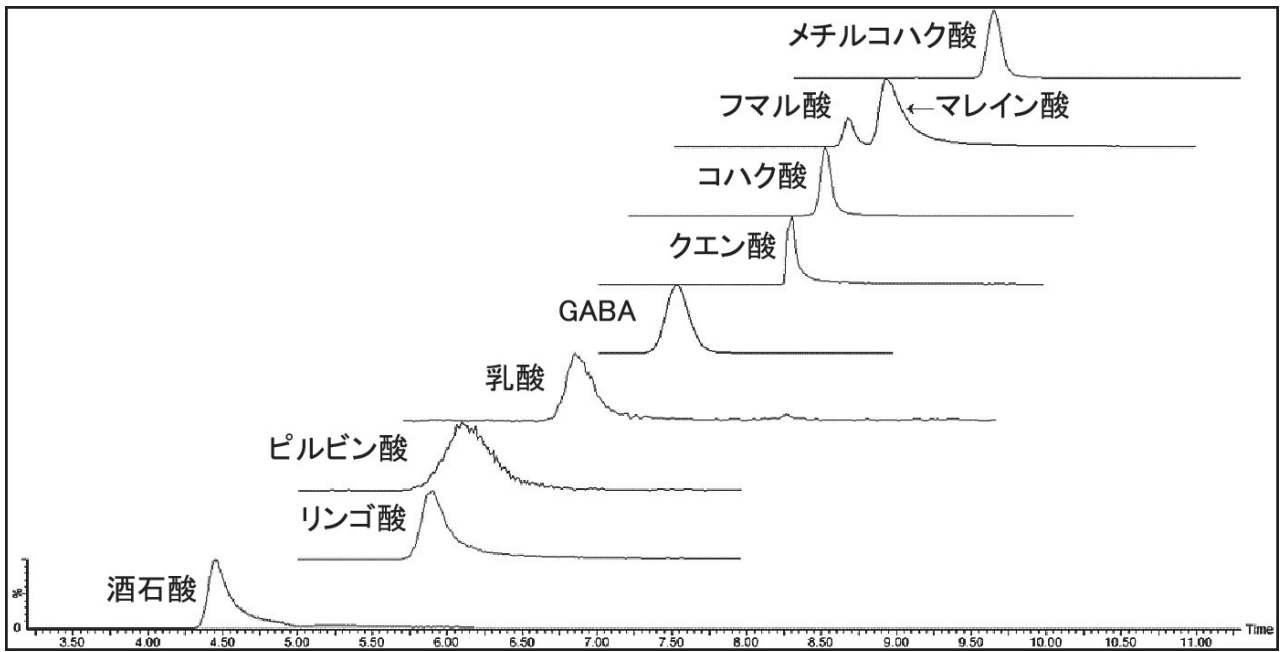


図4 GABA及び有機酸混合標準溶液のマスクロマトグラム (10 ppm)

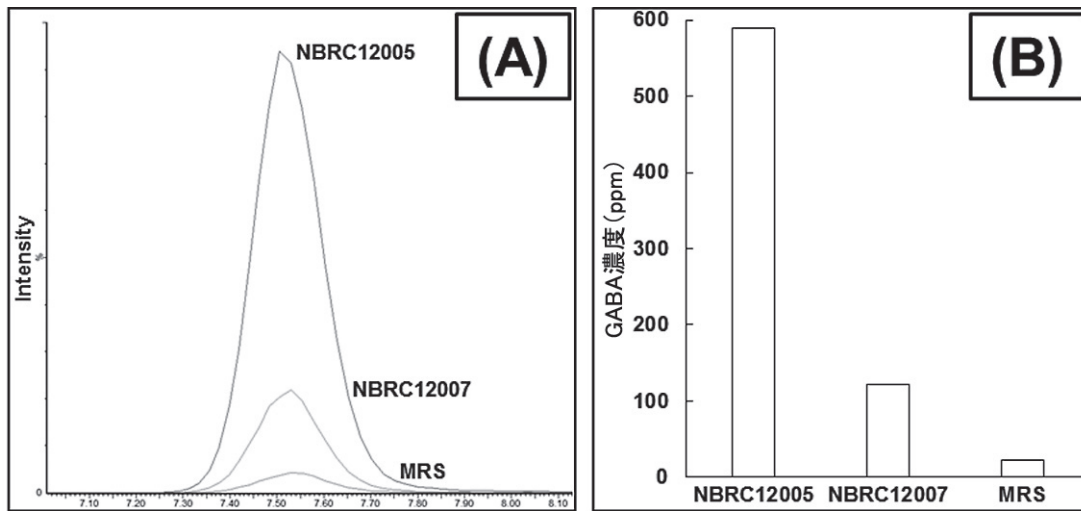


図5 培養液上清のGABA分析結果
(A): マスクロマトグラム, (B): 定量データ

表3 培養液上清中のGABA及び有機酸分析結果 (単位: ppm)

	GABA	酒石酸	リンゴ酸	ピルビン酸	乳酸	クエン酸	コハク酸	フマル酸	マレイン酸
NBRC12005	5.9×10^2	n.d.	2.0×10	n.d.	7.1×10^3	2.0×10^3	5.8×10	n.d.	n.d.
NBRC12007	1.2×10^2	n.d.	8.5	8.0×10	7.1×10^3	2.4×10^3	6.3×10	n.d.	n.d.
MRS培地	2.3×10	n.d.	1.7×10	n.d.	9.9×10	2.4×10^3	4.9×10	n.d.	n.d.

※ n.d.: not detected

研究所では食品から単離した乳酸菌や清酒酵母を多数保管している^{13,14)}。健康志向の高い近年において、風味

に関わる有機酸やタンパク質構成アミノ酸だけでなく、GABAを始めとする機能性アミノ酸の生産特性を把握し

ている保管菌株は魅力的なものとなり、発酵食品を製造する事業所が他社との差別化を望む際に研究所保管菌株を提案しやすくなる。大量の菌株の多種類の成分を分析して特性把握する際、及び保管菌株を用いた発酵食品の分析の際に、誘導体化処理無く簡便に、高感度に、一斉に定量分析が行えることは先述のとおり、比較解析等のデータ解析から原因やメカニズムを解明するうえでも、特に対象を絞らない有用因子の探索においても、非常に効果的である。今後も本検出方法を用いて研究所乳酸菌ライブラリーからGABA高生産菌株の取得を目指すとともに、多成分の一斉分析メソッド構築にむけて、機能性成分や代謝成分の分析メソッドの融合及び追加を行っていく。

4. 結言

発酵試料中のGABAについて簡易評価ならびに定量分析を試みた結果、展開溶媒に酢酸-酢酸エチル-メタノール-水系を用いたTLC分析及びサンプル調製液と溶出溶媒にギ酸を添加したLC-MS分析によってGABAの分離検出と定量分析が行えた。TLC分析では複数サンプルのGABAを短時間で簡易的に検出でき、LC-MS分析では誘導体化なしに短時間でGABAを定量分析できるとともに、GABA及び有機酸を同一のLC-MS条件で分離分析が可能であり、一斉に分析が行えるため、非常に効果的である。

今後、GABA生産菌株の探索を行うとともにタンパク質構成アミノ酸20種類や、オルニチンやシトルリンといった機能性アミノ酸をも同一装置条件および溶媒条件で一斉分析できるように検討を行っていく。

参考文献

- 1) E. Roberts, E. Eidelberg: *Int. Rev. Neurobiol.*, **2**, 279 (1960).
- 2) H. Takahashi *et al.*: *Jpn. J. Physiol.*, **5**, 334 (1955).
- 3) A. M. Abdou *et al.*: *Biofactors*, **26**, 201 (2006).
- 4) Y. Ueno *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1168 (1997).
- 5) S. T. Coleman *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 244 (2001).
- 6) Y. Kato *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 2600 (2002).
- 7) 早川潔 他: *生物工学会誌*, **75**, p.239 (1997).
- 8) T. Takahashi *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 412 (2004).
- 9) 中村敏英 他: *農研機構研究報告*. 食品研究部門, **2**, p.59 (2018).
- 10) H. Yoshida *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 551 (2007).
- 11) A. Hirsch: *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 208 (1951).
- 12) 田中秀典 他: *京都市産業技術研究所研究報告*, No.10, p.49 (2020).
- 13) 和田潤 他: *京都市産業技術研究所研究報告*, No.9, p.61 (2019).
- 14) 廣岡青央 他: *京都市産業技術研究所研究報告*, No.4, p.97 (2014).