

野菜による  $\gamma$ -アミノ酪酸の蓄積

大野一仁 松長 崇 佐野和男

Accumulation of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid by Vegetables

OHNO Kazuhito, MATSUNAGA Takashi and SANNO Kazuo

機能性成分GABA( $\gamma$ -アミノ酪酸)を富化した野菜の食品素材及び加工品を開発することを目的に、GABA生成能の高い野菜のスクリーニングと、GABA生成酵素の特性について検討した。

その結果、GABA生成能が高い野菜は、シシトウ、ナス、ピーマンで、シシトウとナスは、400mg/100g以上、ピーマンも300mg/100g以上にGABAを富化することができた。また、GABA生成酵素の最適反応温度、最適基質pHは、ナス、ピーマンともに同じで、温度は50℃、pHは5.7付近であった。

キーワード：野菜、 $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)、グルタミン酸ナトリウム、補酵素、ピリドキサルリン酸

## はじめに

野菜は、食物繊維、ビタミン、ミネラル等を豊富に含む栄養的に優れた食品である。厚生労働省が推進している「健康日本21」では、食生活の具体的目標として、1日あたりの野菜の目標摂取量を350g以上としており、野菜摂取の重要性が認められている。また、前記の栄養成分以外にも、イソチオシアネート、ルテイン、カロテン、各種ポリフェノール、硫化アリル等の機能性成分も注目されており、新たな機能性に関する研究も行われている。

最近、注目されている機能性成分GABA( $\gamma$ -アミノ酪酸)は、生鮮野菜にも含まれ、加工品では特に味噌漬、糠漬等の漬物に多く含まれていることが知られている。

著者ら<sup>1)2)</sup>は、これまで野菜中のGABA含量とその生成能に注目して、県産野菜のGABA含量を測定し、その富化方法について検討してきた。その際、嫌気処理が必須であったため、それが実用化の障害となっていた。

植物の酵素を用いたGABAの富化に関して、お茶<sup>3)</sup>、米糠・胚芽<sup>4)5)</sup>、玄米<sup>6)</sup>、胚芽米<sup>7)</sup>、大豆もやし<sup>8)</sup>、カボチャ<sup>9)</sup>、アブラナ科植物<sup>10)</sup>、麦若葉<sup>11)</sup>等を利用する方法があるが、いずれも嫌気処理、水浸漬、マイクロ波加熱処理等が必要であった。

そこで、著者ら<sup>12)13)</sup>が温州ミカンで用いた「嫌気処理をせず、低温下で処理する」方法を野菜に応用することを目的に、GABA生成能の高い野菜のスクリーニング、GABAの最適な生成条件、GABA生成酵素の特性について検討したので、その結果について報告する。

## 実験方法

## 1. 市販漬物

供試漬物は56点である。県内製品については、漬物

製造業者から入手し、県外製品については、松山市内で購入した。

## 2. 供試野菜

供試野菜は32点(23種類)で、松山市内で購入した。

## 3. 試料の調製

## (1)市販漬物

漬液のあるものは液切り後、それ以外のものはそのまま、可食部を包丁で細切した。

## (2)生鮮野菜

供試野菜を調理して、可食部を包丁で細切した。さらに、フードプロセッサー(BFC-L20、象印マホービン(株)製)で均質化した。

(3)野菜の $\gamma$ -アミノ酪酸の富化試験

調製した供試野菜に、20%L-グルタミン酸ナトリウム(以下MSGとする)溶液を、0.2~4%になるように添加してよく混合した。これを大気圧下、5~40℃で、20時間放置して反応させた。また、補酵素(ピリドキサルリン酸)を添加する場合は、0.4%ピリドキサルリン酸水溶液を用い、調製した供試野菜に対して1,000 $\mu$ Mになるように添加した。

## (4)GABA生成酵素の抽出

既報<sup>1)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、調製した供試野菜類90gに等量の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH5.8)を加え、ミキサー(MX-X103、松下電器産業(株)製)で3分間ホモジナイズ後、4枚重ねのガーゼでろ過した。得られたろ液を5分間遠心分離(1,800 $\times$ g)して、上澄液に固体硫酸アンモニウムを50%飽和になるように加えて、氷室に一夜放置後、15分間遠心分離(18,000 $\times$ g)した。上澄液を除いて沈殿を集めた後、凍結乾燥機(DC56B型、ヤマト科学製)で1昼夜凍結乾燥し、粉末にして粗酵素を得た。得られた粗酵素はデシケータに入れて、0℃で貯蔵した。

## (5)GABA生成酵素活性の測定

この研究は、「野菜加工品ギャバ富化技術開発研究」の予算で実施した。

抽出した GABA 生成酵素の活性は、抽出原料野菜 10g に相当する粗酵素を 0.1mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.8) に溶解させ、その 0.5ml を、基質 (24mM グルタミン酸ナトリウム、0.2mM ピリドキサルリン酸、0.1mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.8)) 2 ml に添加し、37 で 1 時間反応させて、グルタミン酸ナトリウムの消費割合 (減少率) で表した。グルタミン酸の定量には、F - キットグルタミン酸 (株) J.K.インターナショナル) を使用した。

#### 4. 分析方法

##### (1) GABA およびグルタミン酸

漬物または野菜の均質化試料 5 g に、73% エタノールを加えてホモジナイザーで磨砕して 100ml に定容した後、60 で 1 時間加熱抽出した。冷却後、ろ紙 (No.5B) でろ過し、そのろ液の 2 ~ 20ml をエバポレーターでエタノールを除去した。次に、ジエチルエーテルで色素等の脂溶性物質を除去した。残留するジエチルエーテルをエバポレーターで完全に除去した後、pH2.2 クエン酸リチウム緩衝液で 10ml に定容して、孔径 0.20  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過して分析用試料溶液とした。

分析は、アミノ酸自動分析計 (L-8500 型、株) 日立製作所製) を用い、ニンヒドリン法で行った。

##### (2) 食塩相当量

漬物または野菜の細切・均質化試料 1 g を、ポリエチレン製瓶に秤取り、1%塩酸水溶液 100ml を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出液をろ紙 (No.2) でろ過し抽出原液を得た。これを、1%塩酸水溶液で適宜希釈して分析用試料溶液とした。

分析は、偏光ゼーマン原子吸光光度計 (Z-6100 型、株) 日立製作所製) を用い、フレイム法で行った。

##### (3) pH

野菜、漬物の pH は、そのまま、あるいは、4 倍量の蒸留水を加えて磨砕した溶液について pH メーター (40 型、ベックマン株製) で測定した。

## 結果と考察

### 1. 市販漬物中の GABA 含量

市販の漬物 56 点中の GABA、グルタミン酸 (Glu)、pH、ナトリウム (Na) 含量を測定した結果を表 1 に示す。

入手した漬物のうち、39 点が浅漬で、本漬・古漬は、17 点であり、市販製品の主体が浅漬であることを反映していた。したがって、ナトリウム含量は全体的に低く、430 ~ 3,000mg/100g で、平均 1,200mg/100g であった。これを食塩相当量に換算すると、1.1 ~ 7.5g/100g で、平均 3.1g/100g となり、漬物の低塩化が進んでいることがわかった。また、pH は、4.1 ~ 6.5 の範囲で、平均 5.0 となり、酸性 ~ 弱酸性の範囲にあった。

表 1 は、GABA 含量の高い順に並べているが、GABA は、全ての漬物に含まれており、含量は 1 ~ 200mg/100g で、平均 51mg/100g であった。GABA 含量が 100mg/100g

以上あったのは 9 点で、そのうち 7 点がナス、残りが、ダイコン、カブの浅漬または、もろみ漬であった。このことから、原料野菜としては、ナス、ダイコン、カブの GABA 生成能が高く、また、漬け方としては、浅漬の GABA 含量が高いことが推測された。ただし、ナスの塩漬 (浅漬) でも、53 ~ 200mg/100g (平均 120mg/100g) とかなりのばらつきがあることから、原料や加工方法により、生成する GABA 含量が異なるのではないかと思われた。

### 2. 野菜中の GABA 含量

生鮮野菜中の GABA 含量を測定した結果を図 1 に示す。野菜の種類により GABA 含量は異なり、1 ~ 50mg/100g の範囲にあった。ナス、ミニトマト、カラシナ、ニンジンが高く 20mg/100g 以上含まれていた。

特にナスでは、松山長ナスが 50mg/100g、絹皮が 48mg/100g、水ナス・丸ナスが 33mg/100g と、他の野菜に比べて高い傾向を示した。

市販漬物中で含量の高かったダイコンとカブは、それぞれ、4 mg/100g、11mg/100g と高い値ではなかったことから、漬物製造時に増加していると推察された。

### 3. 野菜の GABA 生成能

野菜の種類別 GABA 生成能について検討した結果を図 2 に示す。温州ミカンの方法<sup>12)13)</sup>と同様に、細切・磨砕した供試野菜試料に対して、MSG を 1% 添加し、大気圧下 20 で 20 時間放置して反応させた。反応後の GABA 含量が 400mg/100g 以上に増加した野菜は、シシトウ、ナス (絹皮、松山長) で、次いでピーマン、ナス (水、丸) が 300mg/100g 以上、ニンジンとカラシナが 200mg/100g 以上であった。

これを、添加した MSG に対する、生成した GABA の割合 (GABA 変換率) に換算すると、シシトウが 85%、絹皮ナス 68%、松山長ナス 64%、水ナス 62%、丸ナス 61%、ピーマン 59%、ニンジン 46%、カラシナ 41% となった。

この結果から、ギャバ生成能の高い野菜としては、シシトウ、ナス、ピーマンが挙げられ、それらはいずれもナス科に属することが共通していた。

著者ら<sup>1)2)</sup>は、これまでに、野菜から GABA 生成酵素を抽出し、その活性は、ピーマン、ホウレンソウが最も高く、次いで、カボチャ、キュウリ、緋カブ、シシトウが高く、トマト、ナス、タマネギでは低かったと報告している。ピーマンとシシトウについては同様な結果であるが、ナスについては逆の結果であった。ナスについては酵素活性以外の要因が関与していると思われた。

また、市販漬物で GABA 含量の高かったダイコンとカブにおいては、反応後の GABA 含量は、それぞれ 75mg/100g (GABA 変換率 13%)、130mg/100g (GABA 変換率 21%) とあまり高い結果にはならなかった。ただし、ダイコンでは、摺り下ろすことにより、191mg/100g (GABA 変換率 34%) と、磨砕試料に比べて 2 倍以上の GABA が生成したことから、試料の形状が GABA 生成に大きく関与していることがわかった。

表1 市販漬物中のGABA分析結果

No.	原料野菜名	漬物の種類	GABA(mg/ 100g)	Glu(mg/ 100g)	Na(mg/ 100g)	食塩相当量 (g/100g)	pH
1	絹皮ナス	塩漬	200	220	900	2.3	5.3
2	ナス	塩漬	170	220	790	2.0	5.1
3	ナス	塩漬	160	330	920	2.3	5.0
4	ナス	もろみ漬	130	95	840	2.1	4.1
5	絹皮ナス	塩漬	120	280	1,300	3.2	5.7
6	ナス	塩漬	120	320	1,200	3.0	5.3
7	ダイコン	たくあん漬	110	240	1,800	4.6	5.6
8	カブ	塩漬	110	300	1,100	2.9	5.1
9	ナス	塩漬	100	160	860	2.2	6.5
10	カブ	塩漬	85	100	810	2.1	5.0
11	ナス	塩漬	78	720	1,500	3.8	4.3
12	ダイコン	味噌漬	75	110	1,400	3.6	4.9
13	ナス	塩漬	73	700	2,100	5.3	4.7
14	ニンジン	味噌漬	70	110	1,300	3.4	4.8
15	キュウリ	味噌漬	68	100	1,300	3.3	4.8
16	キュウリ	糠漬	62	15	640	1.6	4.5
17	キュウリ	塩漬	56	340	1,300	3.4	5.2
18	ダイコン	たくあん漬	56	34	770	2.0	5.3
19	ハクサイ、ダイコン	キムチ	53	1,400	1,400	3.7	5.3
20	絹皮ナス	塩漬	53	100	920	2.3	4.8
21	カラシナ	塩漬	51	13	1,000	2.6	5.1
22	キュウリ	塩漬	46	440	1,100	2.7	4.9
23	ダイコン	塩漬	44	8	1,500	3.7	4.8
24	ナス	糠漬	43	10	930	2.4	4.8
25	ハクサイ	塩漬	42	75	430	1.1	4.2
26	キュウリ	糠漬	41	12	1,400	3.6	5.9
27	カラシナ、菜の花	醤油漬	40	710	1,100	2.9	5.4
28	シシトウ	調味漬	38	390	2,100	5.4	4.6
29	壬生菜	醤油漬	38	630	1,000	2.6	5.5
30	ダイコン	糠漬	37	20	810	2.1	5.2
31	ダイコン	塩漬	36	470	1100	2.7	4.9
32	ダイコン	糠漬	35	30	830	2.1	5.1
33	ハクサイ	塩漬	32	430	1100	2.7	4.9
34	ダイコン	たくあん漬	30	120	1,200	3.1	4.6
35	ナス	糠漬	30	14	1,200	3.1	5.9
36	カラシナ	醤油漬	29	650	1,200	3.1	5.4
37	ハクサイ	塩漬	26	130	840	2.1	5.0
38	ハクサイ	キムチ	26	550	1,100	2.8	5.2
39	カラシナ	塩漬	23	400	1,100	2.8	5.7
40	ハクサイ	キムチ	23	620	790	2.0	5.3
41	ハクサイ	キムチ	22	1,100	1,200	2.9	5.3
42	ハクサイ	キムチ	21	1,100	1,200	3.0	5.5
43	ウリ	塩漬	21	280	1,400	3.6	4.9
44	ハクサイ・ダイコン	キムチ	21	900	2,100	5.3	4.5
45	ハクサイ	キムチ	20	670	1,300	3.2	4.8
46	タカナ	醤油漬	18	670	1,700	4.2	4.2
47	ウリ	奈良漬	17	270	1,600	4.2	4.8
48	ハクサイ	キムチ	15	670	1,000	2.6	5.4
49	キュウリ	塩漬	11	5	540	1.4	4.4
50	ナス、キュウリ	粕漬	8	1,700	3,000	7.5	5.4
51	カブラ	酢漬	7	220	640	1.6	3.5
52	ウリ	塩漬	6	3	1,100	2.8	4.4
53	野沢菜	塩漬	5	260	1,600	3.9	5.5
54	キュウリ、ナス、ミョ	しば漬	3	760	1,600	4.2	4.0
55	キュウリ	醤油漬	3	1,700	2,000	5.1	4.9
56	ラッキョウ	甘酢漬	1	1	800	2.0	2.3
		平均	51	390	1,200	3.1	5.0

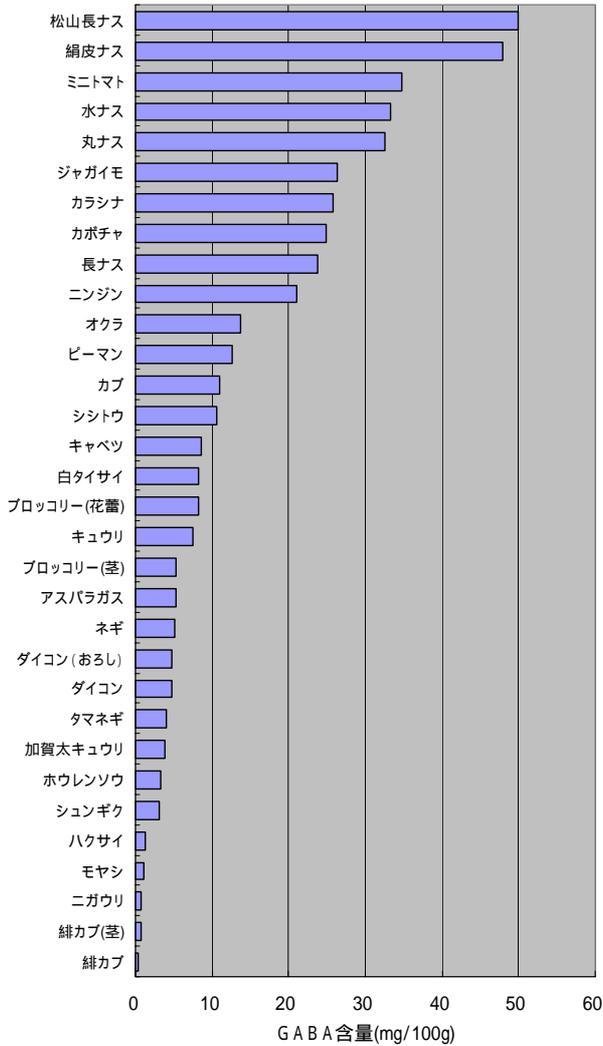


図1 生鮮野菜のGABA含量

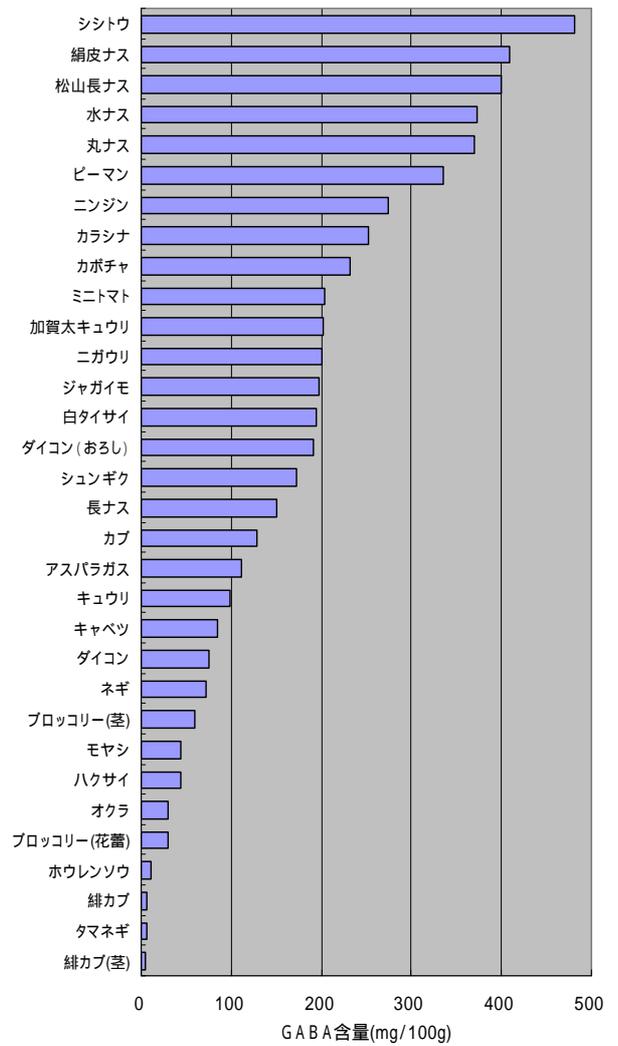


図2 富化処理後のGABA含量

4. 野菜による GABA 富化条件

GABA 生成能の高かった野菜のうち、ナスとピーマンについて GABA 富化条件の検討を行った。

まず、基質である MSG を 0.2 ~ 4 % 添加し、大気圧下、20 で 20 時間反応させて GABA の生成量を見た。基質添加量と反応後のグルタミン酸及び GABA 含量を図 3、4 に示す。

基質の添加量を増やしていくと、生成する GABA の量も増加するものの、MSG 1 % 以上の添加では頭打ちになり、それ以上添加しても生成量はあまり増加せず、基質の残存量が増加した。したがって、MSG の添加量は 1 % 以内が適当であると思われる。これは、温州ミカンにおける結果<sup>1,2)</sup>と同様であった。

次に、反応温度について検討した。ナス及びピーマンの調製試料に MSG を 1 % 添加し、大気圧下、5 ~ 40 で 20 時間反応させて、反応後の試料中のグルタミン酸及び GABA 含量について測定した。また、補酵素を 1 mM 添加した区も設け、添加効果も見た。その結果を図 5、6 に示す。なお、グルタミン酸及び GABA 含量についてはモル濃度で示した(MSG 1 %=53.4mM)。

反応温度については、ナスでは 30 が、ピーマンでは

20 が最も GABA 生成量が高かった。また、補酵素を添加することにより GABA の生成量は増加したが、補酵素を添加した場合は、最適な反応温度が上昇し、40 が最も生成量が高くなり、温州ミカン<sup>1,2)</sup>、大久ら<sup>7)</sup>の結果と同様になった。

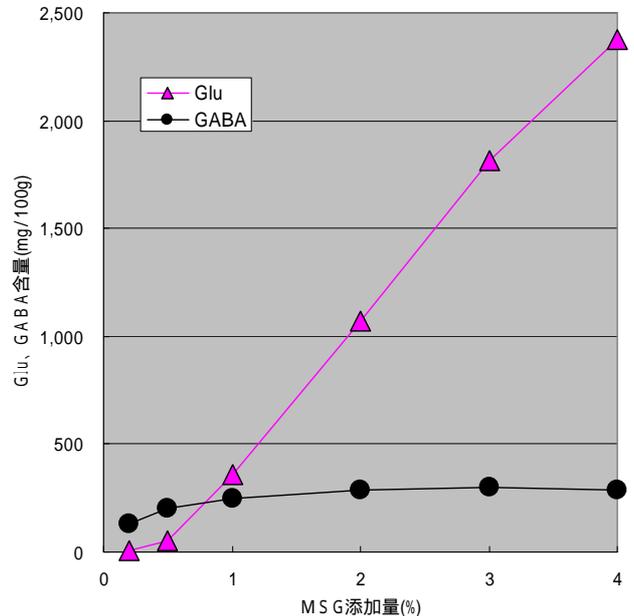


図3 ナスのGABA富化に及ぼす基質添加量の影響

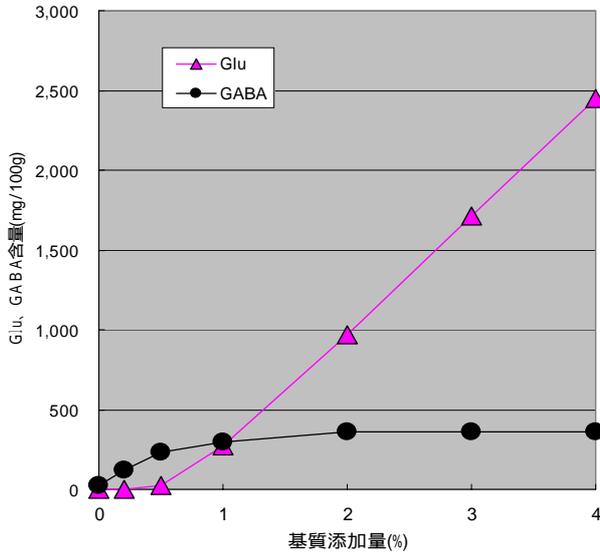


図4 ビーマンのGABA富化に及ぼす基質添加量の影響

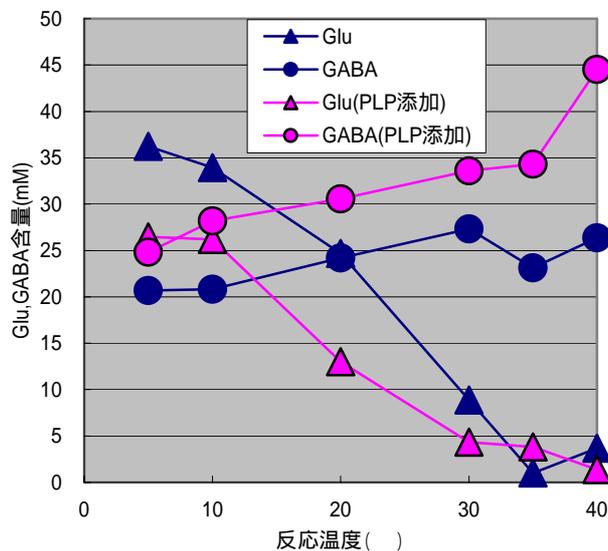


図5 ナスのGABA富化に及ぼす反応温度の影響

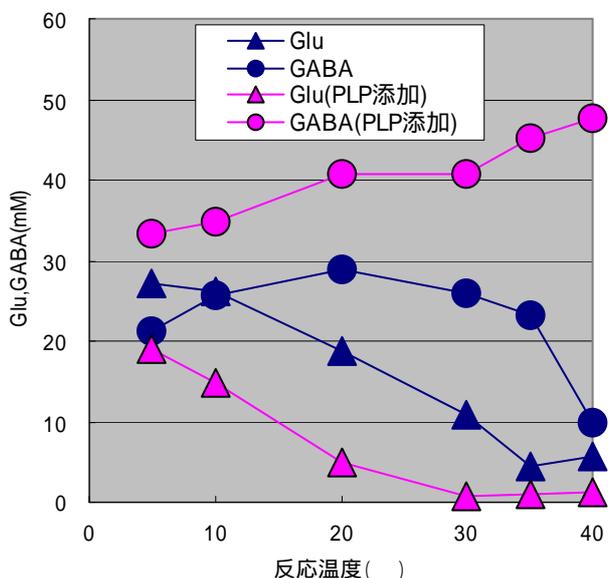


図6 ビーマンのGABA富化に及ぼす反応温度の影響

### 5. GABA 生成酵素の特性

ナスとピーマンから、GABA 生成酵素を抽出した結果、粗酵素としての抽出率は、ナスが 0.87%、ピーマンが 0.48%であった。また、同じ重さの原料野菜から抽出した粗酵素の活性は、ピーマンの方がナスに比べて 1.5 倍以上高かった。

次に、粗酵素の GABA 生成反応における反応温度、及び基質の pH の影響について検討し、温州ミカンの粗酵素と比較した結果を図 7、8 に示す。

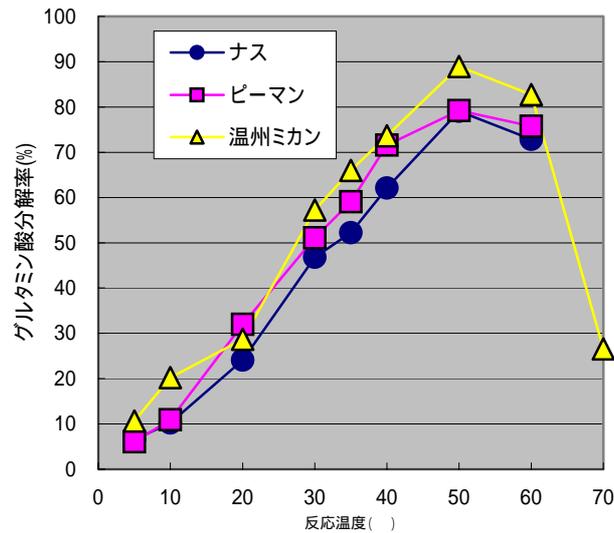


図7 反応温度が抽出酵素の活性に及ぼす影響

反応温度については、ナス、ピーマン、温州ミカンともに、同様な傾向を示し、50 が最も高い活性を示した。4. 富化条件の検討において、ナスでは、反応温度が異なっても GABA 生成量に大きな差はなく、ピーマンでは、30 以上では逆に GABA 生成量が低下していた(図 5, 6)。酵素活性の結果は、この結果とは一致しなかった。

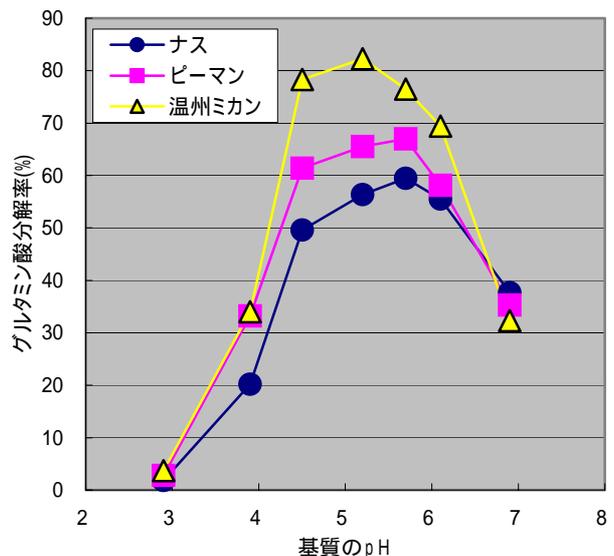


図8 基質のpHが抽出酵素の活性に及ぼす影響

その原因としては、富化試験では、反応時間が 20 時間と長いために、酵素活性が低く、反応速度が遅くても

生成する GABA の含量が高くなり、酵素活性を反映しないことが考えられる。今後、反応時間を考慮して検討することとしたい。

また、今回は、反応温度を 40 までしか検討していないが、酵素活性が 50 付近で最も高かったことから、50 以上での反応についても経時的に検討することとしたい。

基質の pH についても、ナス、ピーマン、温州ミカンともに同様な傾向を示し、ナスとピーマンでは、5.7、温州ミカンでも 5.2 付近が最適な pH であった。

## ま と め

機能性成分 GABA ( - アミノ酪酸) を富化した、野菜の食品素材及び加工品を開発することを目的に、GABA 生成能の高い野菜をスクリーニングし、GABA 生成酵素の特性について明らかにした。

1. 野菜加工品として市販漬物中の GABA 含量を測定した。供試漬物 56 点のうち、GABA 含量が 100mg/100g 以上と高かったのは 9 点で、そのうち 7 点がナス、残りが、ダイコン、カブの浅漬または、もろみ漬であった。これらの原料野菜は、ギャバ生成能が高いことが推測された。

2. 生鮮野菜の GABA 含量を測定した結果、0.5 ~ 50mg/100g で、ミニトマト、ナス、ニンジンが高く、20mg/100g 以上含まれていた。

一方、GABA 生成反応後の含量が 400mg/100g 以上に増加した野菜は、シシトウ、ナス(絹皮、松山長)で、次いでピーマン、ナス(水、丸) が 300mg/100g 以上であった。この結果から、添加したグルタミン酸ナトリウムをギャバに変換した割合が最も高かった野菜は、シシトウで 85%、次いでナスが 60~70%、ピーマンが 59%であった。

3. GABA 生成能の高かったナスとピーマンについて、基質(グルタミン酸ナトリウム)の添加量、反応温度、補酵素の添加がギャバ生成量に及ぼす影響を検討した結果、基質の添加量を増やしていくと生成する GABA の量も増加するが、1%以上の添加では頭打ちになり、それ以上添加しても生成量の増加は僅かで、基質の残存量が増加した。

反応温度については、ナスでは 30 が、ピーマンでは 20 が最も GABA 生成量が高かった。また、補酵素を添加することにより GABA の生成量は増加したが、補酵素を添加した場合は、最適な反応温度が上昇し、40 が最も生成量が高い結果となった。4. ナスとピーマンから、ギャバ生成酵素を抽出した結果、粗酵素としての抽出率は、ナスが 0.87%、ピーマンが 0.48%であった。同じ重さの原料野菜から抽出した粗酵素の活性は、ピーマンの方がナスに比べて 1.5 倍以上高かった。

GABA 生成酵素の反応における最適温度、最適 pH は、ナス、ピーマン共に同様で、温度は 50、pH は 5.7 付近であった。

## 文 献

- 1) 松本恭郎, 大野一仁, 平岡芳信: - アミノ酪酸を蓄積させた機能性食品素材の利用研究(第1報)野菜及び果実中のギャバとグルタミン酸の含量, 平成8年度愛媛県工技研究報告, **37**, 97-100(1996).
- 2) 松本恭郎, 大野一仁, 別所康守, 平岡芳信: - アミノ酪酸を蓄積させた機能性食品素材の利用研究(第2報)農産物の生理機能を活用した - アミノ酪酸の蓄積技術, 平成9年度愛媛県工技研究報告, **38**, 37-77(1997).
- 3) 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森正司, 岡本順子, - アミノ酪酸を蓄積させたお茶とその特徴, 農化, **61**, 817-822(1987).
- 4) Takayo Saikusa, Toshiro Horino, and Yutaka Mori, Distribution of Free Amino Acids in the Rice Kernel and Kernel Fractions and the Effect of Water Soaking on the Distribution, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1122-1125(1994).
- 5) Sadami Ohtsubo, Satoshi Asana, Kazuhito Sato, and Isao Matsumoto, Enzymatic Production of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Using Rice (*Oryzasativa*) Germ, *Food Sci. Technol. Res.*, **6**(3), 208-211(2000).
- 6) 杵淵美倭子, 関谷美由紀, 山崎彬, 山本皓二, 高圧処理を利用した玄米中への - アミノ酪酸(GABA)の蓄積, 食科工, **46**, 323-328 (1999).
- 7) 大久長範, 菅原真理, 阿部雪子, 熊谷昌則, 高橋砂織, 胚芽米と鶏スープによる - アミノ酪酸の生成, 食科工, **47**, 452-454(2000).
- 8) 片桐充昭, 清水純夫, もやし(大豆, グリーングラム, ブラックグラム)の二酸化炭素ガス処理による - アミノ酪酸含量変化, 食科工, **36**, 916-919(1989).
- 9) 伊東禎男, 鷓澤昌好, 村田真由美, 佐藤良二, 中田実穂, 原田信市, - アミノ酪酸高含有素材、その製造方法、該 - アミノ酪酸高含有素材を含む飲食品, 特許出願公開2001-52091(2001).
- 10) 津崎慎二, 高垣欣也, 南條博道, - アミノ酪酸に富むアブラナ科植物を用いた食品, 特許公開 2001-136929(2001).
- 11) 服部利光, 南條博道: 麦若葉粉末, 特許公開 2000-300209(2000).
- 12) 大野一仁, 首藤喬一, 串井光雄, 門家重治, 松本恭郎: 温州ミカンによる - アミノ酪酸の蓄積, 平成13年度愛媛県工技研究報告, **40**, 12-19(2002).
- 13) 大野一仁, 首藤喬一, 串井光雄, 門家重治, 松本恭郎: 温州ミカンによる - アミノ酪酸の蓄積(第2報), 平成14年度愛媛県工技研究報告, **40**, 14-20(2003).