研究ノート

納豆発酵過程での香気成分の変動

木村啓太郎^{1*}, 久保雄司²

¹ 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

² 茨城県工業技術センター 地場食品部門

Flavor Development During Natto Fermentation

Keitarou Kimura^{1*} and Yuji Kubo²

¹ Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NRFI),

2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

² Industrial Technology Institute of Ibaraki Prefecture, 3781-1 Nagaoka, Ibarakimachi, Ibaraki 311-3195

Flavor development during natto fermentation was examined using GC/MS analysis. Steamed soybeans were inoculated with *Bacillus subtilis* (natto) as a starter, fermented for 3, 7, 12, and 18 hours, and the resultant natto products were subjected to GC/MS analysis. Steamed soybeans without starter were analyzed for comparison. MetAlign and AIOutput2 software were employed for semi-automatic GC/MS peak analysis and MS data processing to determine flavor compounds. As a result, a total of 38 volatile compounds were identified. Among these, 23 were also detected in the steamed soybean, revealing different effects during fermentation (6 compounds were reduced or disappeared during fermentation, 12 were relatively stable, and 5 were increased). Twelve flavor compounds including those constituting the major natto flavors, pyridines and branched fatty acids, were strongly induced during the late stage of fermentation. (Received Jan. 25, 2017; Accepted Feb. 23, 2017)

Keywords : natto, flavor compounds, GC/MS, steamed soybean, *Bacillus subtilis*, growth phase

キーワード : 納豆, 香気成分, GC/MS, 煮豆, 納豆菌, 増殖フェーズ

ピラジン類（ピラジン, 2-メチルピラジン, 2,5-ジメチルピラジン, 2,5,3-トリメチルピラジン）と短鎖分岐鎖脂脂肪酸（イソ吉草酸, 2-メチル酪酸, イソ酪酸）およびジアセチルは納豆の主要な香気成分を構成し, いわゆる納豆臭の原因物質である^{1)~3)}。近年, 田中らによって市販納豆の香気成分が詳しく分析され, 上記以外にも 80 種以上の物質が同定された³⁾。

納豆臭は一部の国内消費者や食経験のない外国人には忌避される傾向があり, 納豆臭軽減は商品開発目標の一つである。これまでに納豆臭を制御する試みとして, 低温感受性株の選抜や納豆臭の構成成分であるイソ吉草酸の代謝変異株（ロイシン脱水素酵素欠損株）の開発⁴⁾⁵⁾などが行われた。一方, 納豆には官能的に好ましいとされるマルトール, β -ダマセノンや逆に好ましくないとされる n -ヘキサナール, 1-オクテン-3-オールなど煮豆由来の香気成分が含まれているはずである。しかし, これら煮豆由来成分を含め納豆発酵過程での香気成分消長に関する情報は乏しい。

納豆は煮た大豆に種菌（納豆菌）胞子を接種した後, 約 18 時間発酵させて製造される¹⁾²⁾⁶⁾。我々は, 納豆香気成

分の発酵過程での経時的変化を明らかにするため, 原料の煮豆および発酵後 3, 7, 12, 18 時間（発酵完了）後の納豆について香気成分の一斉 GC/MS 分析を行った。特に, 煮豆由来の香気成分と納豆菌の増殖フェーズに着目し, 納豆菌代謝活動の香気成分変動への影響を評価することを試みた。煮豆の好ましい香りを持つ納豆など新商品を開発するためには, ハイスループットな分析が要求される。そのため, 本研究では半自動的な解析ソフトウェアを使用して GC/MS データの一斉分析を行った。その結果, 納豆の主要な香気成分の多くが増殖フェーズ依存的に発酵後期に生産されること, および煮豆由来香気成分の挙動は一律ではなく, 発酵開始後に急激に減少するもの, 発酵完了まで変動しないもの, 発酵中にさらに増えるものが含まれることが示唆された。

1. 実験方法

(1) 材料

定法に従って大豆（納豆用極小粒）を浸漬・蒸煮後, 納豆菌胞子を噴霧して納豆を調製した⁶⁾。納豆菌株は, *Bacillus subtilis* K-2 株（Mizkan, 半田市）を使用した。煮豆および

¹ 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12, ² 〒311-3195 茨城県東茨城郡茨城町長岡 3781-1

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

納豆は冷凍保存 (−20℃) し、室温で解凍した試料を分析に供した。

(2) GC/MS 分析

i) ヘッドスペース香気成分の捕集

サンプル約1グラム (煮豆あるいは納豆7粒) を入れた GC/MS 分析用ガラスバイアル (20ml, 島津 GLC, 東京) を 4℃ で保持し、分析直前にガラスバイアルを 10 分間 50℃ でゆるく (250rpm, On/Off cycle=5sec/2sec) 攪拌しながら温め、その後攪拌を続けながらヘッドスペース中の香気成分を SPME ファイバー (Solid Phase Micro Extraction Fiber, SUPELCO 社, Bellefonte, 米国, 2cm, 50/30μm DVB/CAR/PDMS) に 20 分間捕集した。

ii) GC/MS 分析

GC/MS 装置 (GCMS-QP2010, 島津製作所, 京都) で香気成分分析を行った。SPME ファイバーに捕集された成分を気化室で離脱させ (250℃, 5 分), 長さ 30m×内径 0.25 mm のガスクロマトグラフ用カラム (DB-5ms, Agilent Technologies, Santa Clara, 米国, 膜厚 0.25μm) に自動導入して成分を分離した (ヘリウムガスフロー, 1ml/min)。カラムオープンの温度コントロールは標準的な設定とした (40℃ 5 分, 180℃ まで直線的に 5℃/分で温度上昇, 250℃ まで直線的に 15℃/分で温度上昇, 250℃ 保持 5 分)。質量分析は、イオン源温度 230℃, インターフェース温度 280℃, 測定レンジ (m/z) 33~350 の条件下で行った。

リテンションインデックス (RI) を求めるため n-アルカン (C5~C20) を平行して分析した。香気成分分析は独立して 3 回行った。

(3) データ解析

ガスクロマトグラフのピーク生データをソフトウェア MetAlign⁷⁾ で解析した。3 回の分析データから求めた相対標準偏差 (RSD, %) が 10 以上のピークを除外し、再現性あるピークデータのみを抽出した。MetAlign の解析パラメータは、質量値制限幅 (Nominal mass Bin) 0.6, 総スキャン数 10000, ピークスロープブファクター 2, ピーク閾値 8

(対ノイズ), ピーク半値幅 25 スキャン, 許容ピークシフト 30 スキャン, と設定した。

MetAlign を用いて抽出されたピークデータをソフトウェア AOutput2⁸⁾ および標準試料の RI とマスマスペクトル情報を持つライブラリー⁹⁾ を用いて解析し物質同定を行った。その際, RI の許容幅を 3, マスマスペクトルと RI の相同性から求められる類似度限度を 0.8 とした。ライブラリーで同定できなかったピークは得られた質量分析データを GCMS-QP2010 の解析ソフトウェアに搭載された GC/MS 質量分析データライブラリー (NIST, National Institute of Standard and Technology, U.S. Department of Commerce, Gaithersburg, 米国) 上で相同性検索し, 類似度 90% 以上を基準として化合物推定を行った。

(4) 納豆菌数計測

サンプリングした納豆 20g をストマッカー袋 (ストマフィルター, TKG 東京硝子機器, 東京) に入れ, 9 倍量の滅菌生理食塩水中で 1 分間破碎した。滅菌生理食塩水で適宜作成した希釈系列を LB 寒天培地 (0.5% 酵母エキス, 1.0% トリプトン, 1.0% 塩化ナトリウム, 1.5% 寒天) に塗布, 37℃ で培養し, 出現したコロニー数を計測した。コロニー計測は独立に 2 回行った。

2. 実験結果

(1) GC/MS 分析

i) GC/MS データ解析

MetAlign を使った GC/MS ピークデータ解析により再現性の高いピークが 80 個得られた。この内 33 個はリテンションインデックスの一致とマスマスペクトル相同性から該当する物質が同定された (Table 1)。更に, GC/MS 質量分析データライブラリーを検索して, 90% 以上の類似度を示した 5 つの香気成分 (2-Methylbutyl acetate, Methylpyrazine, 2,5-Dimethylpyrazine, Trimethylpyrazine, Methylbenzeneacetate) を推定することができた (Table 1)。

同定あるいは推定された香気成分を発酵過程での挙動に基づいて次の 3 つ, 1) 煮豆にある成分, 2) 発酵前期 (3-12

Table 1 Volatile components from steamed soybean and Natto in different stages of fermentation process

category	Compound name*
Steamed soybean	(-)-Limonene ↑, (+)-3-carene →, (+)-terpinen-4-ol →, (1S,3S)-trans-4-Carene →, 1-octen-3-ol →, 2-acetyl furan →, 2-ethyl-1-hexanol →, 2-Methylbutyl acetate ↓, 3-(methylthio)-propanal ↓, 3-octanol →, alpha-terpinene ↑, beta-damascenone →, ethylbenzene →, gamma-nonolactone →, gamma-terpinene ↑, hexyl acetate ↓, is(-)-alpha-pinene →, 1-hexanol ↑, Phenetole ↑, phenylacetaldehyde ↓, Hexanal ↓, Maltol ↓, methylpyradine →
Early stage of fermentation (3-7h)	2-ethylthiophene, 3-methyl-2-buten-1-ol, Guaiacol
Late stage of fermentation (12-18h)	2,3-butanediol, 2-pentyl furan, geranylacetone, isobutyl acetate, methyl 2-methylbutyrate, Propyl propionate, isovarelic acid, isobutyric acid, 2,5-Dimethylpyrazine, Trimethylpyrazine, Tetramethylpyrazine, Methyl benzeneacetate

* arrows showed after compound name mean behaviors of each compound detected from the steamed soybean during the fermentation: increased more than 30%, (↑); decreased more than 30%, (↓); less changed, (→), respectively.

Fig. 1 Behaviors of the steamed-soybean volatile compounds during Natto fermentation

Volatile compounds were analyzed by GC/MS system as described in Methods. A, behaviors of 4 focused flavor compounds of the steamed soybean during the fermentation, β -Damascenone (○), 1-Octen-3-ol (△), Hexanal (×), and Maltol (●). B, behaviors of volatile compounds that decreased during the fermentation, 2-Methylbutyl acetate (○), Phenylacetaldehyde (△), Hexyl acetate (×), and 3-(Methylthio)-propanal (●). C, behaviors of volatile compounds that increased during the fermentation, (-)-limonene (○), l-hexanol (△), α -terpinene (×), γ -terpinene (●). Natto samples fermented for 3, 7, 12, and 18 h were subjected to the head space GC/MS analyses. The values at 0h indicated those of the steamed soybean.

h) から発生する成分, 3) 発酵後期 (12h 以降) に発生する成分, に分類した (Table 1). 1) の煮豆にある成分については更に 3 つ (発酵過程で 3 割以上増える, 3 割以上減る, 変動少ない) に分類した.

ii) 煮豆由来香気物質の挙動

煮豆由来の香気成分のうち官能的に好ましいとされるマルトール, β -ダマセノンや逆に好ましくないとされる n-

ヘキサナール, 1-オクテン-3-オールの変動を Fig. 1 A に, 変動幅の大きかった他成分の変動を Fig. 1 B, C に示した. 甘いカラメル臭を持つマルトール, 青臭さ (草臭さ) の原因物質であるヘキサナールは共に発酵開始後減少し, ヘキサナールは発酵 7 時間以降検出されなかった. フルーツティーなバラ臭を持つ β -ダマセノンとキノコ臭をもつ 1-オクテン-3-オールは発酵中の変動がほぼなかった (Fig. 1

Fig. 2 Behaviors of the major Natto flavor compounds and guaiacol during fermentation

Natto samples fermented for 3, 7, 12, and 18 h were subjected to the head space GC/MS analyses. Amount of the major Natto flavor compounds (Methylpyrazine, 2,5-Dimethylpyrazine, Trimethylpyrazine, Isovaleric acid, Isobutylic acid) and guaiacol were determined as described in the Methods. The values at 0 h indicated those of steamed soybean.

A). フェニルアセトアルデヒドは発酵開始直後から減少しはじめ、2-メチルブチル酢酸、ヘキシル酢酸、3-メチルチオプロパノールも発酵中の減少が大きかった。一方、(–)-リモネン、1-ヘキサノール、テルピネンは発酵中に寧ろ値が上昇した。煮豆にあった成分23種のうち多く(12種)は発酵過程での変動が少なく発酵完了後まで保持されていた (Table 1)。

iii) 主要納豆香気成分の変動

納豆主要香気成分の変動を Fig. 2 に示した。ジメチルピラジン、トリメチルピラジン、吉草酸、イソ酪酸は発酵開始後7時間まで非常に低い値を示し、12時間後以降に急激に上昇した。ピラジン類の中でメチルピラジンは煮豆にも存在し、発酵中の変動がほぼないことが明らかになった。納豆菌の代謝活動の影響を考える上で興味深い挙動を示したグアヤコールを比較対象として表示した。グアヤコールは早い時期(発酵7時間後)に現れ、その後はほぼ一定の値を示した。グアヤコールは香ばしく甘い香り(コーヒー焙煎臭)を持つ物質である。

iv) 煮豆上での納豆菌の増殖

煮豆上での納豆菌の増殖を Fig. 3 に示した。納豆発酵のスターターである納豆菌胞子を通常量 (10^4 CFU/g) 添加し、発芽後増殖した菌数を LB 寒天培地で計測したところ、発酵18時間後には約 10^{10} CFU/g まで殖えた。増殖カーブ

Fig. 3 Growth curve of *Bacillus subtilis* (natto) cells during natto fermentation

Natto samples were harvested at 3, 7, 12, and 18 h of fermentation. *B. subtilis* (natto) cells in each sample were appropriately diluted and grown on LB agar plate as described in Methods. Spores of *B. subtilis* (natto) (10^4 CFU/g) were inoculated to the steamed soybean at 0 h. Viable colony count was duplicated and mean values of cell count (CFU/g) were expressed with error bars (standard deviation).

の変曲点は培養開始後7時間目付近にあり、この時点で対数増殖期から定常期へ移行したと考えられた。

3. 考 察

GC/MS データ解析ソフトウェア MetAlign と AIoutput2 を用いた半自動的な方法で再現性のある GC/MS ピークは 80 個得られ、個々の標準試料を分析することなく速やかに多くの香気成分 (合計 38 種) を検出することができた。一方、田中らが報告した納豆の匂い成分³⁾ すべてを網羅することは出来なかった。同定できなかった成分の一部は AIoutput2 解析で unknown とされた 42 個のピーク中に含まれる可能性がある。今後参照ライブラリーの拡充によって同定成分数は増えると思われる。尚、本研究では、各納豆香気成分の発酵過程での経時的变化を明らかにすることを目的としており各成分の定量分析は行わなかった。各成分の絶対量に関しては、田中らが市販納豆について詳しく報告しているので参照願いたい³⁾。尚、香気成分のヘッドスペースへの放出は試料の粘性に大きく影響される。そのため、粘性の高い食品の香気成分分析では内部標準の使用が困難であることが知られている⁹⁾。納豆の場合、発酵過程で粘性物質ポリ- γ -グルタミン酸が生産されるため試料の粘性変動が大きい。GC/MS 分析では内部標準は使用しなかった。

納豆の主要な香気成分であるピラジン類 4 種 (ピラジン, 2-メチルピラジン, 2,5-ジメチルピラジン, 2,5,3-トリメチルピラジン) と短鎖分岐鎖脂肪酸 2 種 (イソ吉草酸, イソ酪酸) および煮豆に含まれる 23 種の香気成分を含む合計 38 種の香気物質が同定あるいは推定された (Table 1)。元々煮豆にあった香気成分の挙動は一律ではなく、発酵開始後に急激に減少するもの、発酵完了まで変動しないもの、発酵中にさらに増えるものが含まれることが示唆された (Fig. 1)。各成分の消長と沸点の間に明瞭な相関はなく、寧ろ油分やタンパク質などの煮豆成分との親和性や納豆菌の代謝活動が煮豆由来香気成分の挙動を律していると考えられた。(一)-リモネンやトヘキサノール、テルピネンなどが発酵中に増加したのは、発酵の直接的 (納豆菌が生産) あるいは間接的 (煮豆成分の分解が進み、より多く発生) な影響の結果と思われる。

納豆の主要な香気成分のうちメチルピラジン以外は発酵後期 (発酵開始後 12 時間以降) に急激に増加した。これはちょうど納豆菌の増殖フェーズが対数増殖期から定常期へ移行する時間帯に相当する。ピラジン類はアミノ酸と糖類の非酵素的なメイラード反応で作られる¹⁰⁾¹¹⁾。煮豆に含まれる糖と遊離アミノ酸だけでなく、大豆タンパク質とでん粉の分解物もこの反応の材料となることができ、納豆菌が菌体外に生産する主要なプロテアーゼ (alkaline protease E) とアミラーゼ (amylase E) をコードする遺伝子は細胞密度による制御を受けており、細胞密度の高くなった定常期に発現することが知られている¹²⁾¹³⁾。恐らく、

定常期に大豆タンパク質とでん粉の分解が進みメイラード反応に利用可能な糖・アミノ酸の種類、量が増大した結果、側鎖構造の異なるピラジン類が蓄積したのであろう。メチルピラジンだけは煮豆にも存在し、発酵中の量的変動は小さかった。高温高压条件下での蒸煮中に煮豆に含まれる糖と遊離アミノ酸から優先的にメチルピラジンが合成されたのかもしれない。吉草酸とイソ酪酸は煮豆からは検出されず、納豆菌のバリン、ロイシン、イソロイシン代謝経路¹⁾ にこれら短鎖分岐鎖脂肪酸の記載があることから、発酵後期にアミノ酸代謝の老廃物として排出されたと考えられた。納豆の主要香気成分のうち 2-メチル酪酸とジアセチルはピークとして同定されなかった。2-メチル酪酸とイソ吉草酸のピークは重なりやすく³⁾、恐らく生成量が少ないため 2-メチル酪酸検出は困難であったと考えられた。ジアセチルについては、標準物質を分析しても明瞭なピークが出なかったことから、分析に用いた弱極性カラム (DB-5ms) はジアセチルの検出に不向きであることが示唆された。

グアヤコールは他の主要香気成分とは違った挙動を示した (Fig. 2)。グアヤコールは煮豆にはほとんど含まれず、その量は発酵開始後 7 時間ではほぼ最大値に達した。グアヤコールは植物細胞壁由来フェルラ酸の微生物分解によって作られ¹⁴⁾、日本酒などの醸造食品からも検出される¹⁵⁾。納豆菌は endo- β -glucanase などの植物細胞壁分解酵素を持つ¹³⁾¹⁶⁾。納豆でも、大豆由来細胞壁の分解によってグアヤコールが生成した可能性が考えられた。ピラジン類や短鎖分岐鎖脂肪酸よりも早い時期にグアヤコールが現れたことは、細胞壁成分の分解がその内側にあるタンパク質・でん粉の分解よりも先行した結果であると推定された。

納豆菌の代謝活動や物質生産能は主に液体培養法で研究されており、納豆菌と同種の実験室株である *Bacillus subtilis* 168 株を用いた基礎生物学においても揮発成分生成に関する実験的知見は少ない。香気成分改良を目指した商品開発をするためには、香気成分の由来と発生メカニズムを理解した上で、大豆品種の選定や発酵条件の検討、代謝経路を考慮した種菌育種等を行う必要がある。本研究はその参考情報として活用することができる。尚、最近田中らは、冷蔵中の納豆香気成分の変動について報告した¹⁷⁾。イソ酪酸や酢酸、ジアセチルなどが冷蔵保管中に増えることも考慮する必要がある。

4. 要 約

納豆発酵過程での香気成分変動を明らかにするため、納豆菌接種前の煮豆および接種後 3, 7, 12, 18 時間の納豆をサンプリングし、香気成分を GC/MS システムによって分析した。香気成分一斉分析用に開発されたソフトウェア MetAlign および AIoutput2 を用いてデータ解析した結果、38 種の香気物質が同定あるいは推定された。この内 23 種は納豆菌接種前の煮豆からも検出された。煮豆に存在した成分のうち 6 種は発酵が進むにつれて減少あるいは

消滅し、12種については発酵過程での変動は小さく発酵前後での違いが顕著ではなかった。5種は納豆発酵中に増加した。納豆の主要な香気成分であるピラジン類や短鎖分岐鎖脂肪酸を含む12種の香気成分は納豆菌の増殖が定常期に達した頃(12時間後)に急激な上昇が見られた。

本研究の一部は農林水産省委託研究「技術革新を加速化する最先端分析技術の応用研究支援事業(食品の加工法と成分変化のプロファイル分析)」の支援を受けて実施された。GC/MS分析技術をご指導いただいた神奈川工科大学飯島陽子先生と納豆試料を提供していただいた株式会社Mizkanに感謝いたします。GC/MS分析では金房純代博士にご協力いただきました。

文 献

- 1) 田中直義(2008). 糸引き納豆における納豆臭のガスクロマトグラフィー, 「納豆の科学—最新情報による総合的考察」, 木内 幹, 永井利郎, 木村啓太郎, 編著, 建ばく社, 東京, pp. 111-115.
- 2) 田中直義(2010). 納豆の臭い成分分析, 「納豆の研究法」木内幹監修, 永井利郎, 木村啓太郎, 小高 要, 村松芳多子, 渡辺杉夫編, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 80-86.
- 3) Tanaka, N., Yamauchi, T., Katsumata, R., and Kiuchi, K. (2003). Comparison of volatile components in commercial Itohiki-Natto by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **50**, 278-285 (田中直義, 山内智子, 勝俣理恵, 木内幹. 微量固相抽出—ガスクロマトグラフィーによる市販糸引き納豆の揮発性成分の比較. 日本食品科学工学会誌).
- 4) 竹村 浩(2010). 低臭納豆の開発, 「納豆の研究法」木内幹監修, 永井利郎, 木村啓太郎, 小高 要, 村松芳多子, 渡辺杉夫編, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 189-192.
- 5) Takemura, H., Ando, N., and Tsukamoto Y. (2000). Breeding of branched short-chain fatty acids non-producing Natto bacteria and its application to production of Natto with light smells. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **47**, 773-779 (竹村 浩, 安藤記子, 塚本義則. 短鎖分岐鎖脂肪酸非生産納豆菌の育種と低臭納豆への利用. 日本食品科学工学会誌).
- 6) Kubo, Y., Rooney, A. P., Tsukakoshi, Y., Nakagawa, R., Hasegawa, H., and Kimura, K. (2011). Phylogenetic Analysis of *Bacillus subtilis* Strains Applicable to Natto (Fermented Soybean) Production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6463-6469.
- 7) Lommen, A. (2009). MetAlign : interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Anal. Chem.* **81**, 3079-3086.
- 8) Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T., and Fukusaki, E. (2011). GC/MS based metabolomics : development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics*, **12**, 131.
- 9) Iijima, Y., Iwasaki, Y., Otagiri, Y., Tsugawa, H., Sato, T., Otomo, H., Sekine, Y., and Obata, A. (2016). Flavor characteristics of the juices from fresh market tomatoes differentiated from those from processing tomatoes by combined analysis of volatile profiles with sensory evaluation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 2401-2411.
- 10) Adams, A. and De Kimpe, N. (2009). Formation of pyrazines from ascorbic acid and amino acids under dry-roasting conditions. *Food Chem.*, **115**, 1417-1423.
- 11) Yu, A-N., Tan, Z-W., and Wang F-S. (2013). Mechanistic studies on the formation of pyrazines by Maillard reaction between L-ascorbic acid and L-glutamic acid. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **50**, 64-71.
- 12) Do, T.H., Suzuki, Y., Abe, N., Kaneko, J., Itoh, Y., and Kimura, K. (2011). Mutations Suppressing the Loss of DegQ Function in *Bacillus subtilis* (natto) Poly-γ-Glutamate Synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 8249-8258.
- 13) Kubo, Y., Inaoka, T., Miyake, M., Hase, S., Nakagawa, R., Hasegawa, H., Funane, K., Sakakibara, Y., and Kimura, K. (2013). Development of a rifampicin-resistant *Bacillus subtilis* strain for natto-fermentation showing enhanced exoenzyme production. *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 654-657.
- 14) Rahouti, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., and Eriksson, K.-E. (1989). Metabolism of ferulic acid by *paecilomyces variotii* and *pestalotia palmarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2391-2398.
- 15) Sunao, M., Ito, T., Hiroshima, K., Sato, M., Uehara, T., Ohno, T., Watanabe, S., Takahashi, H., and Hashizume, K. (2016). Analysis of volatile phenolic compounds responsible for 4-vinylguaicol-like odor characteristics of sake. *Food Sci. Technol. Res.*, **22**, 111-116.
- 16) Kamada, M., Hase, S., Sato, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., and Sakakibara, Y. (2015). Whole genome complete resequencing of *Bacillus subtilis* Natto by combining long reads with high-quality short reads. *PLOS ONE*, **9**, e109999.
- 17) Tanaka, T., Kimura, S., Kiuchi, K., Suzuki, A., Muramatsu, K., and Mitsuboshi, S. (2012). Changes in aroma of Itohiki-Natto during refrigeration. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **59**, 167-174. (田中直義, 木村百合子, 木内幹, 鈴木あゆ野, 村松芳多子, 三星沙織. 冷蔵中における糸引き納豆のにおいの変化. 日本食品科学工学会誌).

引用 URL

- i) http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=bso&mapno=00280&mapscale=1.0&show_description=hide (2017.1.6)

(平成 29 年 1 月 25 日受付, 平成 29 年 2 月 23 日受理)