合成培地での納豆菌によるピラジン化合物生成 に対する糖（添加）の影響†

山口憲幸*・戸田登志也*・寺本忠夫*・奥平武則*
菅原悦子**・伊東哲雄***

Effect of Sugars on Microbiological Pyrazine Formation by *Bacillus natto* in Synthetic Liquid Medium

Noriyuki YAMAGUCHI*, Toshiya TODA*, Tadao TERAMOTO*,
Takenori OKUHIRA* Etsuko SUGAWARA** and Tetsuo ITO***

* Fujicco Co., Ltd., 6-13-4, Minatojimanakamachi,
Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 650

** Faculty of Education, Iwate University, 3-18-33,
Ueda, Morioka-shi, Iwate 020

*** Department of Agricultural Chemistry, Iwate University,
3-18-8, Ueda, Morioka-shi, Iwate 020

Bacillus natto was cultured in the liquid media containing various carbon sources, and effects of carbon sources on the formation of pyrazines were examined. Reexamination of culture conditions revealed that shaking was better than standing on cell growth and pyrazine production. Fourteen pyrazines were identified by GC and GC-MS. The highest yield of pyrazines was obtained on addition of glucose, and the total pyrazines was more than 42 mg/l of culture broth. Seventeen carbon sources were divided into five groups (A, B, C, D, E) by the pyrazine formation pattern. In the case of group A (D and L-arabinose, xylose, galactose and sorbose), 2-methylpyrazine was the main product. In group B (glucose, fructose, mannose, sucrose and mannitol), trimethyl and tetramethyl derivatives were the main products. The main product of the group C (trehalose and sorbitol) was 3-ethyl-2, 5-dimethylpyrazine, and that of group D (raffinose and stachyose) was 2, 5-dimethylpyrazine. Group E (L-rhamnose, maltose and lactose) was the group which could not belong to any other groups. Yields of pyrazines in the culture broths were parallel to cell growth in each group, except group E.

(Received Feb. 17, 1993)

糸引き納豆の独特の風味を形成する上で重要な役割を担っているピラジン化合物について既にいくつかの報告をした^{1)~4)}。一般にピラジン化合物は、アミノ-カルボニル反応によって生成するといわれ、食品の香ばしい風

味を作り出す基となる成分である。納豆に含まれるピラジン化合物は、発酵前の蒸煮大豆にはほとんど含まれていないことから、納豆菌が関与して生成していることが明らかになった¹⁾。また納豆菌によるピラジン化合物の

† 納豆菌によるピラジン化合物生成に関する研究（第5報）（前報，文献1）～4）

* フジッコ株式会社（〒650 兵庫県神戸市中央区港島中町 6-13-4）

** 岩手大学教育学部（〒020 岩手県盛岡市上田 3-18-33）

*** 岩手大学農学部農芸化学科（〒020 岩手県盛岡市上田 3-18-8）

生成機構を解明するため、培地系での検討を行った結果、ピラジンの生成には培地成分として炭素源と窒素源を必要とすることが明かとなった²⁾。

一連の研究の中で、納豆菌によるピラジン化合物生成に於ける培地炭素源の影響が未検討であるので、本実験では炭素源として 17 種類の糖および糖アルコールを用いて培養し、生成されたピラジン類の定性・定量分析を行った。さらに各培地で生成した種々のピラジン類の生成比についてパターン分析を行い、各培地炭素源間の類似率を算出することにより若干の知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 培地の調製

前培養には L 培地（ポリペプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, NaCl 0.5%, グルコース 0.1%, pH 7.0）を用いた。

本培養は前報⁴⁾に準じ、A 液 (KH_2PO_4 1.4 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 32.2 g, グルタミン酸ナトリウム (MSG) 12.0 g, NaCl 0.5 g, 蒸留水 900 ml) と B 液 (炭素源 20.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, ビオチン 100 μg , 蒸留水 100 ml) を別々に滅菌後無菌的に混合調製した (pH 7.75)。炭素源として 17 種類の糖および糖アルコールを試料としたが、そのうちスタキオースの代用としてソーヤ・オリゴ・ジャパン(株)製の大豆オリゴSOR (スタキオース 67.1%, ラフィノース 24.2%, スクロース 7.9%, その他 0.8%) を供試した。

2. 培養方法

供試菌株は納豆の製造に広く利用されている三浦株 (*Bacillus subtilis* MAFF 10-08100) を用いた。

前培養は、L 培地に一白金耳量の納豆菌を接種し、40°C で 15 時間振とう培養した。本培養にはひとつの試験区に対して 7 個の 300 ml 容バッフル付き三角フラスコ（培地量 100 ml）を用いた。これに種培養物として前培養の 1 ml を添加し、高崎科学器械(株)製の BIOSHAKER TB-12 R により 40°C, 4 日間振とう培養した。静置培養の場合は 800 ml 容培養ビンに 250 ml の培地量とし、同様の条件で培養を行った（各区 3 個）。

3. 納豆菌の生育量

培養途中における納豆菌の生育量の測定には島津(株)製の分光光度計 UV-160 A を使用し、660 nm の吸光度を測定した。また、培養終了後の生育量は乾燥菌体重量（培養液 1 l あたりの g 数で表示）によった。

4. 香気濃縮物の調製

培養液を遠心分離 (8 200 rpm, 15 min) し、各試験区について 500 ml の上清を得た。これを LIKENS-NICKERSON 型連続蒸留抽出装置に入れ、80 ml のジエチルエーテルで 4 時間連続的に香気成分を抽出した。得られた抽出物は無水硫酸ナトリウムにより脱水した後、内標準物質としてブチルヒドロキシトルエン (BHT) を加え、常圧で蒸留濃縮を行うことにより分析用香気濃縮物とした。

5. 香気成分の分離と同定

抽出した香気濃縮物の分析は、ガスクロマトグラフ (GC) および GC に直結したマススペクトロメーター (GC-MS) によって行った。各化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび GC 分析における標準物質との保持時間の一致によった。ピラジン定量分析は内標準ピークと試料ピークの面積比較により、ピーク面積計算は島津クロマトバック C-R1B で行った。分析条件を以下に示す。

(1) GC: 島津 GC-7 A 型ガスクロマトグラフ。検出器: FID。カラム: 化学結合型シリカキャピラリーカラム DB-WAX (30 m × 0.24 mm i.d.)。オープン温度: 80°C → 210°C (2°C/min)。キャリアーガス He

Fig. 1 Effect of shaking on pyrazine production in the culture broth with glucose by *Bacillus subtilis* MAFF 10-08100 during 4 days-incubation at 40°C

Standing: , Shaking:
 TeMP, Tetramethylpyrazine; TrMP, Trimethylpyrazine; 2,3 DMP, 2,3-Dimethylpyrazine; 2,6 DMP, 2,6-Dimethylpyrazine; 2,5 DMP, 2,5-Dimethylpyrazine

Fig. 2 Changes of pH in culture broths with various carbon sources during fermentation by *Bacillus subtilis* MAFF 10-08100

○, D-Xylose; ●, D-Glucose; △, D-Mannose; ▲, Maltose; □, Sucrose; ■, Raffinose

Fig. 3 Growth of *Bacillus subtilis* MAFF 10-08100 in culture broths with various carbon sources

○, D-Xylose; ●, D-Glucose; △, D-Mannose; ▲, Maltose; □, Sucrose; ■, Raffinose

Table 1 Cell weight of *Bacillus subtilis* MAFF 10-08100 and flavor in the culture broth after 4 days-incubation at 40°C

Carbon source	Cell weight	Visc.	Final pH	Flavor
D-Arabinose (D-Ara)	0.70	±	8.82	popcorn-like
L-Arabinose (L-Ara)	1.37	±	7.49	pyrazine-like
D-Xylose (D-Xyl)	1.27	—	7.63	pyrazine-like
D-Galactose (D-Gal)	1.55	—	9.16	ammonia
D-Glucose (D-Glc)	1.97	+	7.40	pyrazine-like
D-Mannose (D-Man)	2.49	+	7.38	pyrazine-like
D-Fructose (D-Fru)	1.99	+	6.84	pyrazine-like, acid
L-Sorbose (L-Sor)	0.71	—	8.93	popcorn-like
L-Rhamnose (L-Rhm)	0.88	—	7.88	yogurt-like
Maltose (Mal)	2.65	—	7.38	yogurt-like
Trehalose (Tre)	1.92	+	7.32	molds-like
Sucrose (Suc)	2.09	+	6.62	pyrazine-like, acid
Lactose (Lac)	0.35	—	8.87	ammonia
Raffinose (Raf)	0.78	—	8.75	ammonia-like
Stachyose (Sta)	1.29	—	9.25	ammonia, pyrazine
Mannitol (Mnit)	1.93	+	7.02	pyrazine-like
Sorbitol (Sbit)	1.70	—	7.21	pyrazine-like

Cell weight : g/l of culture broth, Visc. : Viscosity, + : strong, ± : moderate, — : poor

(カラム内流速 1.2 ml/min).

(2) GC-MS: Hewlett Packard 5710-A ガスクロマトグラフ直結 Hitachi Model M-80 B マススペクトロメーター. イオン化電圧: 20 eV. カラム: 化学結合型シリカキャピラリーカラム DB-WAX (50 m×0.32 mm i.d.). オープン温度: 80°C→210°C (2°C/min).

6. 生成ピラジン類のパターン分析⁵⁾

培地炭素源を A, B, C, D, ……とした場合, 各培地によって生成した 14 種類のピラジン類の生成量を数値群パターン A; (a₁, a₂, a₃, …… a₁₄), B; (b₁, b₂, b₃, …… b₁₄) とみなし, A と B とのパターン類似率 S (A, B) をベクトルの内積の公式から算出した. それによるとパターン類似率は cos θ で表される.

$$S(A, B) = \cos \theta = \frac{(\vec{OA}, \vec{OB})}{|\vec{OA}| |\vec{OB}|}$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n a_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n b_i^2}}$$

本実験に用いた 17 種類の炭素源のすべての組合せについて計算を行い, cos θ の値から 5 段階に分けてグラフ化した.

実験結果及び考察

1. 培養条件の検討

納豆菌は偏性好気性菌に属し, より好気的な条件下で良好な生育を示すため, バッフル付三角フラスコによる振とう培養を試みた. Fig. 1 に示すように振とう培養では静置培養に比較してピラジン類の生成量が著しく増加し, テトラメチルピラジン (TeMP), トリメチルピラジン (TrMP), 2,3-ジメチルピラジン (2,3-DMP) の生成量はそれぞれ約 6 倍, 10 倍, 14 倍となった. よって, 以後の実験はすべて振とう培養によった.

2. 納豆菌の生育に対する培地炭素源の影響

生育に伴う過程での pH の変化を調べたところ, Fig. 2 に示すように一旦 pH が下がってから再び上昇する傾向がみられたが, グルコース, スクロースで pH 低下が著しかった. またキシロース, ラフィノースでは pH の低下傾向は小さく, 24 時間後には初発 pH の 7.75 付近まで回復していた.

培地 pH の低下の原因としては, 解糖系の反応が急速に進行し, 有機酸が過剰生産され培地中に蓄積されたためと考えられた⁶⁾. スクロース, グルコース, マルトースは著しい培地の pH 低下を引き起こすことから有

機酸の生産に適した炭素源であるといえる. また培地 pH の上昇は, アミノ酸の脱アミノ反応によりアンモニアが生成したためと考えられるが, 特に pH の値が高かったキシロース, ラフィノースは納豆菌による資化性が弱く, 窒素源として加えた MSG が優先的に分解利用され, 最終段階の脱アミノ反応が促進されたためと考えられた.

Fig. 3 に示す生育曲線から, 培養初期においては炭素源としてスクロース, グルコースを培地に加えた場合の納豆菌の生育が早い, 対数増殖期の終わり頃からマンノース, マルトースの場合も大きな差がなくなった. これに対してキシロース, ラフィノースを添加した場合は生育が劣っていた. 培養 4 日後の菌体重量の測定では, マルトースおよびマンノースを添加して培養した場合の菌体重量が他の炭素源を加えた場合よりも優っていた (Table 1).

3. 納豆菌が生成する香気成分の分析

培地炭素源としてグルコースを用いた場合, Fig. 4

Fig. 4 Gas chromatogram of pyrazines in the culture broth with glucose by *Bacillus subtilis* MAFF 10-08100 after 4 days-incubation at 40°C

Column, 30 m × 0.24 mm fused silica capillary column DB-WAX; Column temp., 80°C → 210°C (2°C/min); Carrier gas, helium at 1.2 ml/min; Detector, FID

1: P, 2: 2 MP, 3: 2,5 DMP, 4: 2,6 DMP, 5: 2 EP, 6: 2,3 DMP, 7: 2 E 6 MP, 8: 2 E 5 MP, 9: TrMP, 10: 3 E 2,5 DMP, 11: 2 E 3,5 DMP, 12: 5 E 2,3 DMP, 13: TeMP, 14: 2, 6 DMP 3 MP

P = pyrazine, M = methyl, DM = dimethyl, TrM = trimethyl, TeM = tetramethyl, E = ethyl

に示すように 14 種類のピラジンが検出された。ピラジンの種類としては、置換基のないピラジンと 13 種類のアルキルピラジンであり、その置換基としてはメチル基とエチル基のみであった。

次に Table 2 に示すように総ピラジン量としては、グルコース 42 mg/l、フルクトース 37 mg/l、スクロース 23 mg/l と多く、一方ラクトース (0.3 mg/l) とマルトース (0.5 mg/l) は著しく少なかった。

また Table 1 で示したように納豆菌の乾燥菌体重量は、グルコース、フルクトース、スクロースの場合は 1.97~2.09 g/l と近い値を示した。一方、マルトースでは 2.65 g/l と最高であり、ラクトースでは 0.35 g/l と最低であった。

以上のように、乾燥菌体重量の多いものが必ずしも総ピラジン量が多いとは限らなかった。しかし、少なくともグルコース、フルクトース、スクロースを炭素源として用いた場合は乾燥菌体重量と総ピラジン量は関連があると思われ、またこれらにおいて生成したピラジン組成にも共通点が見られたことから、次に各ピラジンの生成

比を検討した。

17 種類の炭素源のすべての組合せについてピラジンの生成比をパターン分析し Fig. 5 に示した。類似率は 0~1 で表されるため 5 段階に分けて表示した。縦横に示した炭素源の内、最も類似率の高い組合せ (■; 1.00~0.88) が図中で同じ行 (もしくは列) にあるものはすべて類似性の高い同一のグループと判断できることから、各炭素源のグループ分けを行った。その結果、17 種類の炭素源を 5 つのグループ A, B, C, D, E に分けることができたが、最後のグループ E は前 4 者のいずれにも属さない炭素源とした。

A グループは、D および L-アラビノース、キシロース、ガラクトース、ソルボースからなっており、特徴としては 2-メチルピラジンの生成量が比較的多く、総ピラジン量の 50~70% を占めていた。B グループは、グルコース、フルクトース、マンノース、スクロース、マンニトールからなり、TrMP, TeMP の生成量が多く、総ピラジン量の 60~90% を占めていた。特にグルコース、フルクトース、スクロースでは共に 2,3-DMP,

Table 2 Pyrazine production in the culture broth fermented by *Bacillus subtilis* MAFF 10-08100* during 4 days-incubation at 40°C

Carbon source	P	2 MP	2, 5 DMP	2, 6 DMP	2, 3 DMP	TrMP	TeMP	2 E P	2 E 6 MP	2 E 5 MP	3 E 2, 5 DMP	**	2, 6 DE 3 MP	Total P
D-Arabinose	246	2 271	292	401	46	62	12	43	19	t	t	5	30	3 427
L-Arabinose	391	3 920	75	620	453	559	97	191	77	16	384	11	35	6 829
D-Xylose	214	3 309	108	812	286	528	296	151	93	18	489	8	133	6 445
D-Galactose	366	2 983	443	512	82	131	66	128	31	9	t	148	148	5 047
D-Glucose	199	2 623	114	676	6 164	13 395	18 524	81	58	19	259	156	118	42 386
D-Mannose	44	225	29	88	537	985	990	22	15	0	271	38	0	3 244
D-Fructose	231	658	91	465	2 622	11 608	17 739	67	65	21	3 145	292	105	37 109
L-Sorbose	549	7 301	360	1 651	114	91	20	151	87	27	t	t	192	10 543
L-Rhamnose	4	472	482	842	21	66	54	71	118	93	t	6	t	2 229
Maltose	21	147	77	22	59	95	89	14	t	t	63	t	0	587
Trehalose	8	76	14	18	117	165	254	12	5	7	259	11	60	1 006
Sucrose	0	202	28	120	1 054	4 452	16 299	34	27	0	615	278	237	23 346
Lactose	35	78	19	10	4	6	55	5	0	0	67	54	4	337
Raffinose	5	112	485	50	20	108	110	0	0	14	26	0	18	948
Stachyose	17	254	379	99	12	68	7	7	3	12	11	4	0	873
Mannitol	8	83	12	57	508	1 877	6 485	11	9	0	224	103	28	9 405
Sorbitol	0	29	9	14	93	179	369	13	0	0	499	22	22	1 249

*: As $\mu\text{g/l}$ of culture broth, **: 5 E-2, 3 DMP + 2 E-3, 5 DMP

P=Pyrazine, MP=Methylpyrazine, DMP=Dimethylpyrazine, TrMP=Trimethylpyrazine, TeMP=Tetramethylpyrazine, E=Ethyl-, DE=Diethyl-, t=trace

Fig. 5 Characterization of pyrazine formation pattern

$$S(A, B) = \cos \theta = \frac{(\vec{OA}, \vec{OB})}{|\vec{OA}| |\vec{OB}|} = \frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n a_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n b_i^2}}$$

A; ($a_1, a_2, a_3, \dots, a_{14}$)

B; ($b_1, b_2, b_3, \dots, b_{14}$)

$a_1, a_2, a_3, \dots, a_{14}, b_1, b_2, b_3, \dots, b_{14}$, Concentrations of pyrazine derivatives

Full names for abbreviations of sugars and sugar alcohols are shown in Table 1.

TrMP, TeMP の生成が多いために総ピラジン量の圧倒的な増大につながっていた。C グループは、トレハロース、ソルビトールであり、また D グループは大豆オリゴ糖のラフィノース、スタキオースであった。この両グループは総ピラジン量は少なかったが、C グループは 3-エチル 2,5-ジメチルピラジンが、また D グループでは 2,5-ジメチルピラジンが多かった。E グループは、A~D グループに属さないもので L-ラムノース、マルトース、ラクトースであった。

次に、上述の 4 グループの納豆菌の生育量と総ピラジン量を比較し Fig. 6 に示した。その結果、グラフ上で

各グループごとにかたまって位置したことから、生成したピラジン類のパターンが類似した炭素源は、納豆菌の生育量と総ピラジン量においても類似性が高いことがわかった。

本実験の結果を納豆製品に置き換えてみると、納豆のピラジン臭には大豆原料の糖含量が関与すると考えられた。大豆にはグルコース、スクロース、ラフィノース、スタキオースが存在するが、スクロース、スタキオース含量が多い⁷⁾ことから納豆の風味形成の一つの因子として大豆原料中のスクロース含量の影響が最も大きいことが推察された。

4. ピラジン化合物の前駆体について

ピラジン化合物の生成経路として、小菅ら⁸⁾⁹⁾は 2 分子のアセトインと 2 分子のアンモニアから TeMP が生成することを明らかにしたが、本実験の場合、アンモニアは MSG の脱アミノ反応により生成すると考えられた。一方、アセトインは解糖系の副産物であるといわれている¹⁰⁾。浅田ら¹¹⁾は、*E. coli* の場合、培地に糖が添加されたとき多量のアセトインを生成し細胞外に蓄積すること、また、糖の分解により生ずるビルビン酸はパリン生成系が終末産物および carboligase (CGase) の脱抑制などで生成するアセトアルデヒドで強く負の調節を受けているためアセトイン生成系に導かれることを明らかにした。そして、アセトイン生成経路の生理学的役割をビルビン酸過剰生産時の緊急処理機構であると推定している。

これらのことから、TeMP の前駆体であるアセトインは、ビルビン酸が過剰生産されることにより誘導されると考えられる。本実験において、グルコース、フルクトース、スクロースを用いた場合は培地 pH の低下が著しく、TeMP の生成量も多かったことから、アセトイン発酵が良好に行われたと推定される。

以上のように納豆菌による TeMP の生成については説明が可能であるが、それ以外のピラジン類生成については疑問点が残されている。しかし、小菅らの生成経路を基に推定すると、炭素数 6 および 7 の DMP, TrMP は炭素数 4 のアセトインのみの関与で生成するとは考えにくく、炭素数 3 などの化合物が関与して生成することが予想された。

要 約

- (1) 納豆菌の培養液から連続蒸留抽出によって得た全揮発成分より、14 種類のピラジン化合物を同定した。
- (2) 窒素源として MSG、炭素源としてグルコースを

Fig. 6 Relation of cell weight to dependence of total pyrazine production on cell weight in the culture broths fermented with various carbon sources by *Bacillus subtilis* MAFF 10-08100

○ : Group A ● : Group B ▨ : Group C ▤ : Group D
 Full names for abbreviations of sugar alcohols are shown in Table 1.

用いた合成培地の場合、振とう培養では静置培養に比べピラジン類の生成量が著しく増加し、テトラメチルピラジン、トリメチルピラジン、2,3-ジメチルピラジンの生成量はそれぞれ約6倍、10倍、14倍となった。

(3) 17種類の培地炭素源は、生成したピラジン類のパターン分析から5つのグループに分けられた。各グループは納豆菌の生育量と総ピラジン量の関連においても類似性が認められた。

本研究を行うに当たり、成分の定性に協力頂いた小川香料株式会社中央研究所分析研究室の森田耕造氏、西村修氏に深く感謝致します。また御助言を承りました岩手大学農学部櫻井米吉教授に深く感謝致します。本研究発表を快諾して下さったフジッコ株式会社山岸八郎社長並びに役員各位に感謝致します。

本研究の一部は、平成4年日本食品工業学会第39回

大会（於東京）にて発表した。

文 献

- 1) SUGAWARA, E., ITO, T., ODAGIRI, S., KUBOTA, K. and KOBAYASHI, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 311 (1985).
- 2) 伊東哲雄・菅原悦子・櫻井米吉・武山進一・内沢秀光・小田切敏：農化，**61**，963 (1987).
- 3) ITO, T., SUGAWARA, E., MIYANOHARA, J., SAKURAI, Y. and ODAGIRI, S.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **36**, 762 (1989).
- 4) 菅原悦子・伊東哲雄・米倉裕一・櫻井米吉・小田切敏：日食工誌，**37**，520 (1990).
- 5) 田村真八郎・鈴木忠道・松永隆司：日食工誌，**32**，847 (1985).
- 6) 坂崎利一：医学細菌同定の手引（近代出版），p. 38 (1974).
- 7) 菅野彰重・高松春樹・高野伸子・秋本隆司：日食

- 工誌, 29, 105 (1982).
- 8) 神谷弘子・足立多平・小菅卓夫: 薬誌, 84, 448 (1964).
- 9) KOSUGE, T., ZENDA, H., TSUJI, K., YAMAMOTO, T. and NARITA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 35, 693 (1971).
- 10) 坂崎利一: 新細菌培地学講座, 初版, 上 (近代出版), p. 357 (1978).
- 11) 浅田芳宏・藤森優仁: 農化, 60, 369 (1986).
(平成 5 年 2 月 17 日受理)
-