

合成培地での納豆菌によるピラジン化合物 生成に対するアミノ酸(添加)の影響

菅原悦子*・伊東哲雄**・米倉裕一**
櫻井米吉**・小田切敏**

Effect of Amino Acids on Microbiological Pyrazine Formation by *B. natto* in a Chemically Defined Liquid Medium

Etsuko SUGAWARA*, Tetsuo IRO**,
Yuichi YONEKURA**, Yonekichi SAKURAI**
and Satoshi ODAGIRI**

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

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

Bacillus natto was cultured in the chemically defined liquid medium which contain various amino acids as nitrogen source, and effects of amino acids on the formation of pyrazines were examined. The amino acids which are related to glutamic acid on metabolism, L-glutamic acid, L-aspartic acid, L-arginine and L-proline, promoted the best growth. Yields of pyrazines produced in the culture broth were not always parallel to cell growth. In the case of L-serine, L-aspartic acid, L-alanine and ammonium citrate, whole pyrazines were yielded about 10 mg/l and above, and mostly consisted of tetramethylpyrazine. Pyrazines which have a characteristic side chain corresponding to the amino acid present in the medium were not detected. (Received Jun. 21, 1989)

納豆の重要な香气成分はピラジン化合物であり、これらは納豆菌が関与して生成している可能性が高いことをすでに報告した¹⁾²⁾。そこで前報³⁾では大豆煮熟液に各種アミノ酸を添加して納豆菌の液体培養を試み、ピラジン化合物の生成量を定量したところ、L-スレオニンやL-セリン添加の場合、ピラジン化合物の生成量が多い

ことが判明した。しかし、この時納豆菌がピラジン化合物生成のための前駆体を多量に生成するために、その後のアミノ-カルボニル反応によってピラジン化合物が生成するのか、最終段階まで酵素反応で効率よくピラジン化合物が生成されるのかは不明である。そこで今回は納豆菌が関与するピラジン化合物の生成機構をより明確にするために培地組成をより明瞭な合成培地とし、ピラジン化合物の抽出方法も LIKENS-NICKERSON 型連続蒸留抽出装置を用いる方法と、抽出の際全く加熱条件のはいらない Porapak Q 吸着剤を用いる方法を併用して比較検討した。

1. 実験方法

(1) 培養条件

培地組成は藤井⁴⁾が納豆菌の粘質物の生成に関する研究に用いたものを改変して調製した。すなわち、KH₂PO₄ 1.36 g と Na₂HPO₄ · 12 H₂O 32.2 g, NaCl 0.5 g を 900 ml の水道水に溶解し、窒素源として Table 1 に示した 14 種のアミノ酸と 2 種のアンモニウム塩及び尿素を用い、窒素量として 1% 相当量になるように添加した溶液を A とし、10 本の 500 ml の三角フラスコに 90 ml づつ分注した。また、水道水 100 ml にグルコース 20 g, MgSO₄ · 7 H₂O 0.5 g, ビオチン 1 mg を溶解した溶液を B とし、10 本の試験管に 10 ml づつ分注した。A, B を別々に殺菌後、無菌的に A に B を混合し培地とした。培養はこの培地に納豆菌(高橋 2 号菌)を少過剰植菌し、40℃、通常 4~5 日間とした。ただし、納豆菌の増殖が悪い時は 10 日間まで培養を試みた。菌の生育のよかった培地では 3 回の繰り返し培養を行い、ピラジン化合物の生成量はそれらの平均値で比較した。

(2) におい濃縮物の調製

各培養液(納豆菌体を含む) 1 l を LIKENS-NICKERSON 型連続蒸留抽出装置に入れ、エーテルで 4 時間連続的に抽出した。続いて前報³⁾と同様に処理してにおい濃縮物を得た。また各培養物 300 ml を 5000 rpm で 10 分間、5℃ で冷却遠心し、菌体を除去した。この上澄液を試料とし、精製した Porapak Q 吸着剤(2.7 g)を充填したカラム(内径 1 cm × 高さ 11 cm)に 1 分間に 1 ml の流速で流し、におい成分を吸着させた⁵⁾。エーテル 100 ml でにおい成分を溶出させ、エーテル溶出液は前報³⁾と同様に処理してにおい濃縮物とした。

(3) におい成分の分離、同定

ガスクロマトグラフ(GLC)および GLC に直結し

* 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 (020 岩手県盛岡市上田 3-18-8)

Table 1 Cell Growth of *Bacillus natto* and flavor in the media

Amino acid and others	Growth	Incubation (days)	Flavor	Final pH
Ala	卅	5	pyrazine-like, acid	6.85
Val	卅	4~5	acid	6.70
Leu	+	10	acid	—
Ile	卅	5	natto-like	6.70
Ser	卅	5~6	pyrazine-like, acid	7.25
Thr	卅	5~7	natto-like, acid	6.90
Met	+	10	Japanese radish-like	—
Phe	+	10	acid	—
Trp	—	10	—	—
Asp	卅	4	pyrazine-like, acid	7.10
Glu	卅	4	pyrazine-like, acid	6.85
Lys	—	10	—	—
Arg	卅	4	acid	6.55
Pro	卅	4	popcorn-like	6.70
Am cit.	卅	5	pyrazine-like, ammonia	6.60
Am ac.	+	10	—	6.54
Urea	—	10	—	9.20

Note — : no growth, + : poor growth, 卅 : moderate growth, 卅 : better growth, 卅 : the best growth.

Am cit.: diammonium citrate, Am ac.: ammonium acetate.

た質量分析計 (GC-MS) を用いて分析した。化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質との GLC の保持時間の一致によった。

① GLC: 島津 GC-5A 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 PEG 20 M (ϕ 0.25 mm×50 m)。オープン温度: 60°C→200°C (3°C/min)。キャリアーガス: N₂, カラム内流速 1.6 ml/min (スプリット比 20:1)。ピーク面積の計算は島津クロマトパック C-R 2A によった。

② GC-MS: HITACHI G 3000 ガスクロマトグラフ直結 HITACHI M-2000 マススペクトロメーター。イオン化電圧: 70 eV。カラム: 化学結合型シリカキャピラリーカラム Supelco wax 10 (ϕ 0.25 mm×50 m)。オープン温度: 40°C (5 min hold)→200°C (3°C/min)。MS データ処理: HITACHI M-0201 形システム。

2. 結果及び考察

(1) 培地窒素源の変化と菌の増殖

培地の窒素源を変えた時の納豆菌の増殖状況は Table 1 に示した通りであり, L-アラニン, L-バリン, L-イソロイシン, L-セリン, L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, L-アルギニン, L-プロリン, クエン酸二アン

モニウム添加培地では培養 1 日で液面に菌膜がはり, 増殖は良好であった。菌の増殖は L-グルタミン酸代謝に密接な関係をもつアミノ酸の添加培養で良好であった。

次いで L-スレオニンがよく, 2~3 日で菌膜が形成された。その他のアミノ酸添加培地では 10 日以上培養しないと生育しないものや全く増殖のみられないものもあった。そこで L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, L-アルギニン, L-プロリン, クエン酸二アンモニウム塩を添加した場合は 4 日間培養, L-アラニン, L-バリン, L-イソロイシン, L-セリン, L-スレオニンは 5~6 日間培養後, ピラジン化合物を抽出した。他のアミノ酸添加の場合は菌の増殖が悪いので, ピラジン化合物の生成はきわめて少ないものと考えた。

(2) 連続蒸留抽出法と Porapak Q 吸着剤による吸着法によるピラジン化合物の生成量の比較

LIKENS-NICKERSON 型連続蒸留抽出装置による方法と Porapak Q 吸着剤による方法でのピラジン化合物の生成量の比較を Table 2 に示した。Porapak Q 吸着剤を用いた方法では抽出段階で二次的にピラジン化合物が生成する可能性はないが, 連続蒸留抽出法では培養液を加熱するためその可能性が高い。そこで二つの抽出

Table 2 Pyrazine production in the culture broth^{a)}

Pyrazine		MP	2,3-DMP	2,5-DMP	TrMP	TeMP	DEP	DEMP	MPP	Total P
Amino	Acid									
Ala	N	0.10	0.01	0.06	3.63	13.72	0.15	0.09	—	17.75
	P	—	0.33	1.07	1.37	4.98	—	0.06	—	7.81
Val	N	0.27	0.06	0.13	0.66	0.45	0.02	0.17	—	1.76
	P	—	—	0.20	0.01	0.01	—	—	—	0.22
Ile	N	0.13	0.03	0.13	0.06	0.02	—	—	—	0.37
	P	0.01	—	0.04	—	—	—	—	—	0.05
Ser	N	0.05	0.06	0.01	4.81	51.13	0.34	0.01	—	56.42
	P	—	+	3.76	33.36	211.33	—	1.98	7.64	258.06
Thr	N	0.34	1.35	0.464	0.77	0.14	0.04	0.01	—	3.10
Asp	N	0.02	0.01	0.09	2.25	7.46	0.08	0.06	—	10.00
Glu	N	0.13	0.11	0.02	2.04	3.36	0.07	0.05	—	5.78
	P	0.05	—	0.30	0.97	5.66	—	0.38	—	7.35
Arg	N	0.10	—	—	0.03	—	—	—	—	0.13
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pro	N	0.14	0.06	0.05	0.13	0.08	—	—	—	0.45
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Am Cit.	N	0.08	0.02	0.04	2.79	14.94	0.24	0.32	—	18.43
None	N	+	+	+	+	+	—	—	—	0.01

a): As mg/l of culture broth, None: Chemically Defined Liquid Medium added L-Serine without inoculation.

MP=Methylpyrazine, DMP=Dimethylpyrazine, TrMP=Trimethylpyrazine, TeMP=Tetramethylpyrazine, DEMP=Diethyl-2-methylpyrazine, DEP=2,6-Diethylpyrazine, EDMP=2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine, MPP=2-Methyl-5-propenylpyrazine.

Am Cit.: Ammonium citrate dibasic.

N: Method of extraction by Likens-Nickersons apparatus.

P: Method of absorption by Porapak Q.

方法を併用し比較した。その結果、連続蒸留抽出法においてピラジン化合物の定量値が特に高いという傾向は得られなかった。L-セリン及びL-グルタミン酸添加ではPorapak Q吸着法での定量値が高く、また空試験の結果からも連続蒸留抽出法でピラジン化合物が二次的に生成する可能性はあまり考慮する必要はないと判断した。二法で定量されたピラジン化合物の値は多くのアミノ酸添加の場合には大差はなかったが、最も多量にピラジン化合物が検出されたL-セリン添加では吸着法が蒸留法の4倍以上になっておりこれについては再検討する必要がある。

(3) 培地組成の違いによるピラジン化合物生成量の比較

添加されたアミノ酸の種類によるピラジン化合物の生成量の比較を Table 2 に示した。L-グルタミン酸、L-

アスパラギン酸の添加培地では、菌の増殖もよく、ピラジン化合物の生成量も多かった。L-プロリン、L-アルギニンでは菌の増殖はよかったが、ピラジン化合物の生成量は極めて低かった。L-セリン、L-アラニンでは菌の増殖はあまり良好ではなかったにもかかわらず、ピラジン化合物の生成量は高かった。このように菌の増殖とピラジン化合物の生成量には相関がみられなかった。これは菌の代謝経路上、菌体の増殖に関与しやすいアミノ酸とピラジン化合物の生成経路に関与しやすいアミノ酸とがあることを示していると考えられる。特に、L-セリンを添加した培地ではかなり大量のピラジン化合物が生成されており、そのほとんどがテトラメチルピラジンであった。次に、多量に生成したグループはL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸で、クエン酸二アンモニウムもこのグループと同じレベルであった。

クエン酸二アンモニウムが直接ピラジン化合物になるのか、アミノ酸に変換後、ピラジン化合物になるのかは不明であるが、ピラジン化合物の生成経路に関与しやすいことが判明した。このグループではL-セリンと同様、ピラジン化合物の大半がテトラメチルピラジンであった。ピラジン化合物の全生成量が多ければテトラメチルピラジンが多く生成されることが明かとなった。また、テトラメチルピラジン以外に、7種のピラジン化合物を同定したが、添加したアミノ酸の構造に関連して、特徴的な側鎖を持ったピラジン化合物は同定できなかった。このことは、アミノ酸から直接ピラジン化合物が生成される可能性は薄く、ある程度分解され、簡単な中間体となり、これを経て生成されることを意味していると考えられる。

微生物によるピラジン化合物の生成機構解明の研究で、DEMAIN⁶⁾はイソロイシン・バリン代謝経路の一酵素が欠損した *Corynebacterium glutamicum* のミュータントを用いて、テトラメチルピラジンを5日間で3 g/l 生産させた。この時、ピルビン酸からアセト乳酸を経てアセトインが生成され、2分子のアセトインと2分子のアンモニアからテトラメチルピラジンが生成されていると報告している。L-アラニン、L-セリン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸は構造上、比較的容易にピルビン酸になり得、クエン酸もTCAサイクルを構成する有機酸である。よってこれらの添加培地で大量にテトラメチルピラジンが生成された結果は、DEMAIN⁶⁾の報告した経路を裏付けるものと考えられる。また、アセトインないし関連物質が存在する場合にはアミノカルボニル反応で化学的にピラジン化合物が生成することが知られている。RIZZI⁷⁾はアセトインとアンモニウムアセテートからpH 6.88, 22°C, 17.5時間という条件でテトラメチルピラジンが相当量生成したことを報告している。以上より納豆菌はピラジン化合物生成のための前駆体を多量に生成している可能性も高いと考えられる。しかし、納豆菌が関与して最終段階まで酵素的にピラジン化合物が生成する可能性は全くないとは言いきれず、先に述べた以外の生成経路も含めて更に検討する必要があると考えられた。

3. 要約

各種アミノ酸を添加した合成培地で納豆菌を培養し、ピラジン化合物の生成量を比較検討し、ピラジン化合物生成に対する納豆菌の役割について考察した。

(1) 各種アミノ酸を添加した合成培地での納豆菌の増殖は代謝上、L-グルタミン酸と関連の深いアミノ酸(L-

グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-アルギニン、L-プロリン)で良好であった。

(2) 培養液からのピラジン化合物の抽出方法として、加熱条件の有無を考慮して、LIKENS-NICKERSON型連続蒸留抽出装置を用いる方法とPorapak Q吸着剤を用いる方法を比較したが、連続蒸留抽出法でピラジン化合物が二次的に生成している可能性は薄かった。

(3) 納豆菌の増殖の良否とピラジン化合物の生成量には相関はみられず、L-セリン、L-アスパラギン酸、L-アラニン、クエン酸二アンモニウムで、10 mg/l前後、あるいはそれ以上のピラジン化合物を検出し、その大半はテトラメチルピラジンであった。

(4) 各種アミノ酸の特徴的な側鎖をもつピラジン化合物は確認できなかったため、この化合物はアミノ酸から直接生成されず、より簡単な中間体をへて生成される可能性が高い。

(5) 納豆菌が関与するピラジン化合物生成はその前駆体を多量に生成することによる可能性は高いが、最終段階まで酵素的に進むことも考えられ、さらに検討が必要である。

終わりに臨み、本研究の一部は文部省科学研究費(奨励A課題番号59780095)によったことを記し、謝意を表します。

また、本研究を行うに当たり御指導、御助言を賜りましたお茶の水女子大学小林彰夫教授、久保田紀久枝助教に心から感謝致します。

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・内澤秀光・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) 藤井久雄: *農化*, **37**, 615 (1963).
- 5) 鷺野由紀・久保田紀久枝・小林彰夫: *家政誌*, **40**, 265 (1989).
- 6) DEMAİN A.L., JACKSON M. and TRENNER N.R.: *J. Bacteriol.*, **94**, 323 (1967).
- 7) RIZZI, P.G.: *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 349 (1988).

(平成元年6月21日受理)