

納豆における2, 5-ジメチルピラジンおよび  
トリメチルピラジンの生成機構解明

お茶の水女子大学 基幹研究院 自然科学系

野田 響子

納豆の香気成分として2,5-ジメチルピラジン (2,5-DMP) や2,3,5-トリメチルピラジン (T3MP) などのピラジン類が挙げられる (Kimura and Kubo, 2017)。加工食品中においてピラジン類は、メイラード反応の副反応であるストレッカー分解によりすることが知られており (Shibamoto et al., 1979)、納豆においても同様であると考えられる。すなわち、納豆菌により大豆のタンパク質やデンプンが分解されて生成したアミノ酸と糖がメイラード反応ならびにストレッカー分解を起こすことでピラジン類が生成すると考えられるが (Kimura and Kubo, 2017)、納豆は発酵期間がおよそ 40°C で 1 日と短いことから、ストレッカー分解のみにより生成するとは考えにくい。枯草菌においては、スレオニンの代謝により 2,5-DMP および T3MP が生成することが報告されている。例えば、スレオニンがスレオニンデヒドロゲナーゼにより酸化を受けた後、脱炭酸して生成したアミノアセトン 2 分子が反応することで 2,5-DMP が生成し T3MP は、アミノアセトンと糖代謝によりピルビン酸から生成したアセトイン、アンモニアが反応することで生成することが報告されている (Larroche et al., 1999, Zhang et al., 2019)。筆者の研究グループは、納豆における 2,5-DMP および T3MP の生成に納豆菌が関連し、スレオニンが重要な前駆体となることを報告したが (Tsutsuura et al., 2022)、納豆菌によるスレオニンの代謝との関連は不明である。本研究では液体培養において納豆菌が 2,5-DMP および T3MP を生成する条件を検討した後、安定同位体で修飾したスレオニンまたはグルコースを添加した液体培地で納豆菌を培養し、生成した 2,5-DMP および T3MP、アミノアセトンに安定同位体が挿入されたことを確認した。また、実験的に納豆を作成し、ピラジン類、スレオニン、アミノアセトンを測定することで納豆中のピラジン類生成と納豆菌のスレオニン代謝の関連を調べた。

## 実験方法

### 材料および供試菌

大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill, スズマル) は東京都のスーパーマーケットで購入した。納豆菌 (*Bacillus subtilis* NBRC3335) は、芽胞懸濁液を作成した。スラントから 1 白金耳とり、5 mL の Heart Infusion (HI) 培地に植菌し、37 °C で 24 時間振盪培養した。その後、培養液 100  $\mu$ L を HI 寒天培地に塗布した。37 °C で 24 時間培養した後、25 °C で 10 日間静置した。培地に生育した菌を白金耳で掻き取り、滅菌したリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) に懸濁した。この懸濁液を 80 °C で 20 分加熱したものを納豆菌芽胞懸濁液として使用した。

### 納豆菌の液体培養

培地は、0.01% (w/v) ビオチン含有 Spizizen 培地 (minimum 培地; Fujii, 1962) にペプトンやアミノ酸を添加して作成した。アミノ酸は逆浸透膜透過水 (RO 水) に溶解後、水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 7.2 に調整し、ろ過滅菌して用いた。

ピラジン類生成とスレオニンおよびアミノアセトンの関連についての検討では、ペプトン溶液および L-スレオニン溶液を、それぞれ 5 mg/mL、0.5 mg/mL となるように minimum 培地に添加した。この液体培地 5 mL に納豆菌芽胞懸濁液を  $10^{4.5}$  CFU/mL となるよう植菌し、37 °C で 0, 6, 18, 24, 48, 72 時間振盪培養した。

スレオニンの影響についての検討では、L-スレオニン溶液、L-グルタミン酸溶液、または L-セリ

ン溶液を、それぞれ 1, 5, 10, 20 mg/mL となるように minimum 培地に添加した。この液体培地 5 mL に納豆菌芽胞懸濁液を  $10^{4-5}$  CFU/mL となるよう植菌し、37 °C で 96 時間振盪培養した。

安定同位体を用いた検討においては、L-スレオニン- $^{13}\text{C}_4$ ,  $^{15}\text{N}$  溶液を minimum 培地に、またはグルコースを D-グルコース- $^{13}\text{C}_6$  に置き換えた minimum 培地に L-スレオニン溶液を、それぞれ 1 mg/mL となるように添加した。これらの液体培地 5 mL に納豆菌芽胞懸濁液を  $10^{4-5}$  CFU/mL となるよう植菌し、37 °C で 96 時間振盪培養した。

### 納豆の作成

大豆に重量比で 6 倍の RO 水を加え、一晚浸漬した。浸漬液を捨て、オートクレーブにて 121 °C で 20 分蒸煮した。蒸煮した大豆 (30 g) に納豆菌懸濁液を  $10^{4-5}$  CFU/mL となるよう植菌し、37 °C で 0, 6, 18, 24, 48, 72 時間培養した。

### 納豆菌の菌数測定

納豆菌の液体培養後は適宜希釈し、HI 寒天培地を用いた平板培養法で菌数を測定した。作成した納豆 5 g に PBS 45 mL を加えて 2 分間スマッキング後、適宜希釈して HI 寒天培地を用いた平板培養法で菌数を測定した。

### 2,5-DMP および T3MP の定量

納豆菌の液体培養液を  $1600 \times g$ , 4 °C で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。上清 (5 mL) に塩化ナトリウムを 1.8 g 加え、水酸化ナトリウムで pH 11 以上に調整した後、酢酸エチルでピラジン類を抽出した (5 mL  $\times$  3 回)。酢酸エチル層に硫酸水素ナトリウムを加えて 2 時間放置後、自然ろ過 (Advantec No. 2、東洋濾紙、東京、日本) した。ろ液を窒素吹き付けにより 2 mL 以下に濃縮後、酢酸エチルで 2 mL に定容した。

作成した納豆 (5 g) に 15 mL の 20% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液を加えて 2 分間スマッキング後、洗い込み 5 mL 加えて  $1600 \times g$ , 4 °C で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。沈殿に 20% TCA 溶液を 20 mL 加えて  $1600 \times g$ , 4 °C で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。2 回分の上清に RO 水を加えて 50 mL に定容した。この溶液 5 mL に水酸化ナトリウムを加えて pH 11 に調整し、DIAION HP20 に供した。1 mM 水酸化ナトリウム溶液で洗浄した後、ピラジン類をアセトニトリル 1.5 mL で溶出した。この溶出液に塩化ナトリウムを加えて 2 層に分離し、上層 (アセトニトリル層) を回収した。アセトニトリル層に硫酸ナトリウムを加えて 2 時間放置後、クロマトディスクで濾過した。

試料を GC-FID (Agilent 7890A GC) で分析し、外部標準法により 2,5-DMP および T3MP を定量した。注入口および検出温度は 240 °C で、スプリットレスモードで注入した。カラムは DB-WAX (60 m  $\times$  0.250 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ) を用い、昇温条件は続く通りである。5 分間 40 °C を保持後、5 °C/min の速度で 100 °C に昇温し、つづいて 3 °C/min の速度で 140 °C まで昇温し、再び 5 °C/min の速度で 240 °C に昇温し、10 分間 240 °C で保持した。

## スレオニンおよびアミノアセトンの定量

納豆菌の液体培養液を  $1600 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。上清を 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.1) で 100 倍に希釈した。この希釈液 10  $\mu\text{L}$  に 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.1) 970  $\mu\text{L}$  と 0.4 mg/mL クロロギ酸 9-フルオレニルメチル (Fmoc-Cl) アセトニトリル溶液 20  $\mu\text{L}$  を加えた。 $40^{\circ}\text{C}$  のブロックヒーターで 20 分加熱した。この反応液を蛍光検出器付きの HPLC (HPLC-FL) で分析した。

作成した納豆 (1 g) に 100 mL の 0.1 M 塩酸を加えて 2 分間ストマッキングした。この懸濁液を 30 分攪拌し、自然ろ過 (Advantec No. 2) した。ろ液を 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.1) で適宜希釈した。スレオニンの定量には、この希釈液 50  $\mu\text{L}$  に 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.1) 850  $\mu\text{L}$  と 0.4 mg/mL Fmoc-Cl アセトニトリル溶液 100  $\mu\text{L}$  を加えた。 $40^{\circ}\text{C}$  のブロックヒーターで 20 分加熱した。この反応液を HPLC-FL で分析した。アミノアセトンの定量には、この希釈液を前処理して誘導体化試薬を加えた。水で平衡化した InertSep SAX (3 mL; ジーエルサイエンス、東京、日本) に供し、非吸着画分 500  $\mu\text{L}$  に 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.1) 500  $\mu\text{L}$  と 0.4 mg/mL Fmoc-Cl アセトニトリル溶液 50  $\mu\text{L}$  を加えた。 $40^{\circ}\text{C}$  のブロックヒーターで 20 分加熱した。この反応液を HPLC-FL で分析した。

HPLC-FL (ポンプ: HITACHI L-6200、検出器: HITACHI L-2485 FL Detector Elite LaChrom) では、カラムに Mightysil RP-18 ( $250 \times 4.6$  mm, 5  $\mu\text{m}$ ) を用い、展開溶媒をアセトニトリル:水:ギ酸 = 40: 60: 0.1 (v/v/v) とし、カラム温度を  $35^{\circ}\text{C}$  とした。検出波長は、励起波長を 266 nm、蛍光波長を 305 nm に設定した。外部標準法によりスレオニンおよびアミノアセトンを定量した。

## 2,5-DMP および T3MP、アミノアセトンの LC-MS/MS 分析

納豆菌の液体培養液を  $1600 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心分離した。2,5-DMP および T3MP においては、この上清を LC-MS/MS で分析した。LC-MS/MS の条件を Table 4 に示した。アミノアセトンの分析においては、この上清 200  $\mu\text{L}$  に 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.1) 600  $\mu\text{L}$  と 0.4 mg/mL Fmoc-Cl アセトニトリル溶液 200  $\mu\text{L}$  を加え、 $40^{\circ}\text{C}$  のブロックヒーターで 20 分加熱した反応液を LC-MS/MS で分析した。LC-MS/MS (HPLC: Prominence series (島津製作所)、検出器: TripleTOF 4600 (Sciex)) は、エレクトロスプレーイオン化法のポジティブモードで検出した。カラムは Inertsil ODS-3 ( $150 \times 2.1$  mm) を用い、流速は 0.2 mL/min、カラム温度は  $40^{\circ}\text{C}$  とした。展開溶媒は 2,5-DMP および T3MP の分析にはメタノール:水:ギ酸 = 15: 85: 0.1 (v/v/v) を用い、Fmoc 化アミノアセトンの分析にはアセトニトリル:水:ギ酸 = 40: 60: 0.1 (v/v/v) を用いた。

## 実験結果及び考察

### 納豆菌の液体培養におけるピラジン類の生成とスレオニンおよびアミノアセトンの関連

先行研究において、ペプトンとスレオニンを添加した minimum 培地で納豆菌を培養した場合に 2,5-DMP および T3MP の生成が認められた (Tsutsuura et al., 2022)。まずは納豆菌によるスレオニンの代謝とピラジン類の生成の関わりを確認するため、5 mg/mL ペプトンおよび 0.05 mg/mL スレオニンを添加した minimum 培地で納豆菌を培養し、生菌数、ピラジン類、スレオニン、アミノアセトンの変化を確認した (Figure 1)。この条件において納豆菌は、培養開始から 18 時間後に定常期に達した (Figure 1A)。2,5-DMP、T3MP は培養開始から 48 時間後以降に生成が認められた (Figure 1B)。スレオニンの量は納豆菌の生育とともに減少し (Figure 1C)、アミノアセトンはピラジン類と同じ培養開始から 48 時間後以降に生成した (Figure 1D)。

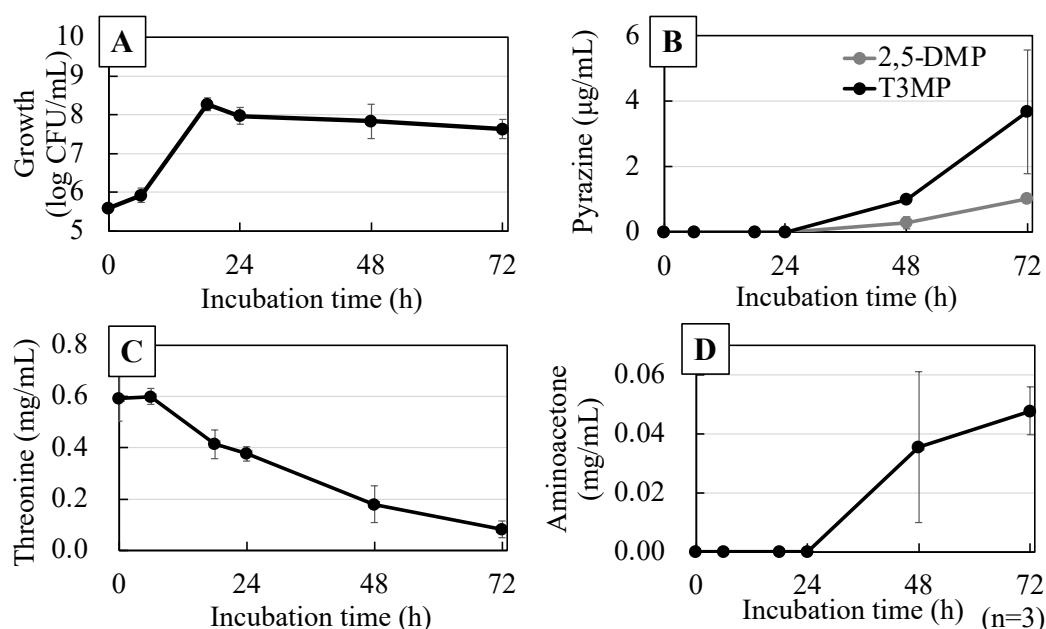


Figure 1. Growth of *B. subtilis* (A) and change in pyrazine (B), threonine (C), and aminoacetone (D) in minimum media added peptone and L-threonine (n=3).

### スレオニンが納豆菌のピラジン類生成に与える影響

納豆菌の液体培養において、スレオニンがピラジン類生成に与える影響を検討するため、スレオニン、グルタミン酸、セリンを 1–20 mg/mL となるように添加した minimum 培地で納豆菌を培養し、96 時間後の生菌数、2,5-DMP、T3MP の生成量を調べた (Figure 2)。スレオニンおよびグルタミン酸を添加した場合、アミノ酸を添加しないで培養した場合と同程度まで納豆菌が生育したが、セリンを添加した場合、納豆菌の生育は認められなかった (Figure 2A)。スレオニンを添加した場合、2,5-DMP と T3MP とともに生成したが、グルタミン酸を添加した場合は T3MP のみ生成し、セリンを添加した場合はいずれも生成しなかった (Figure 2B, C)。以上の結果から、スレオニンの添加が納豆菌の液体培養における 2,5-DMP および T3MP の生成に重要であることが示された。

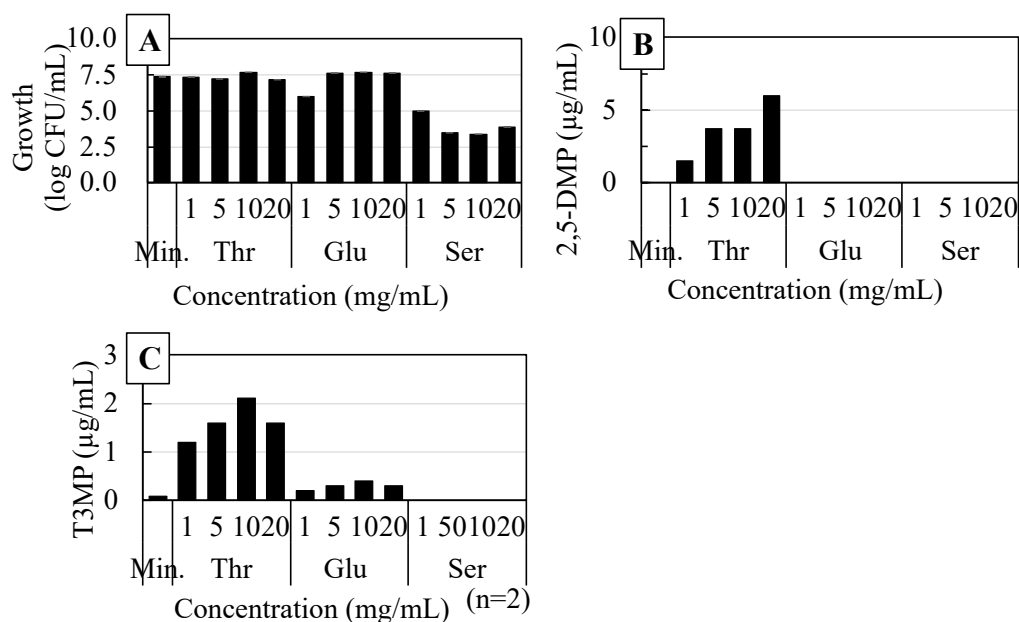


Figure 2. Growth of *B. subtilis* and formation of 2,5-dimethylpyrazine (2,5-DMP; **B**) and 2,3,5-trimethylpyrazine (T3MP; **C**) in minimum media added L-threonine (n=2).

#### 安定同位体を用いた液体培養における納豆菌のピラジン類生成の検討

枯草菌においては、スレオニンの代謝によりアミノアセトンを経て 2,5-DMP および T3MP が生成することが報告されている ([Larroche et al., 1999](#), [Zhang et al., 2019](#))。納豆菌の液体培養における 2,5-DMP および T3MP の生成においても同様であることを確認するため、L-スレオニン- $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}_4$  または D-グルコース- $^{13}\text{C}_6$  を用いた minimum 培地で納豆菌を培養し、LC-MS/MS を用いて生成したピラジン類、アミノアセトンに  $^{14}\text{N}$  または  $^{13}\text{C}$  が挿入されるか確認した。

安定同位体を持たない 2,5-DMP は m/z 109 の分子イオンとして検出されるが、培地に L-スレオニン- $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}_4$  を用いた場合、2,5-DMP は m/z 113 または 117 の分子イオンとして検出された (Figure 3 左側)。D-グルコース- $^{13}\text{C}_6$  を用いた場合、2,5-DMP は m/z 109 または 112 の分子イオンとして検出された。2,5-DMP のメチル基を含む 3 つの炭素と 1 つの窒素からなる環の半分または両側はスレオニンに由来して生成したと言える。

安定同位体を持たない T3MP の分子イオンは m/z 123 として検出されるが、培地に L-スレオニン- $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}_4$  を用いた場合、T3MP は 127 の分子イオンとして検出された (Figure 3 右上)。T3MP の 1 つのメチル基を含む環の半分はスレオニンに由来して生成した。

アミノアセトンは Fmoc-Cl で誘導体化して検出した。安定同位体を持たない Fmoc 化アミノアセトンの分子イオンは m/z 296 として検出されるが、培地に L-スレオニン- $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}_4$  を用いた場合、アミノアセトン誘導体は m/z 300 の分子イオンとして検出された (Figure 3 右下)。したがって、アミノアセトンはスレオニンを由来として生成したと言える。

以上の結果から、納豆菌の液体培養により生成した 2,5-DMP および T3MP は、納豆菌によりスレオニンが代謝されて生成したアミノアセトンに由来して生成したことが示された。

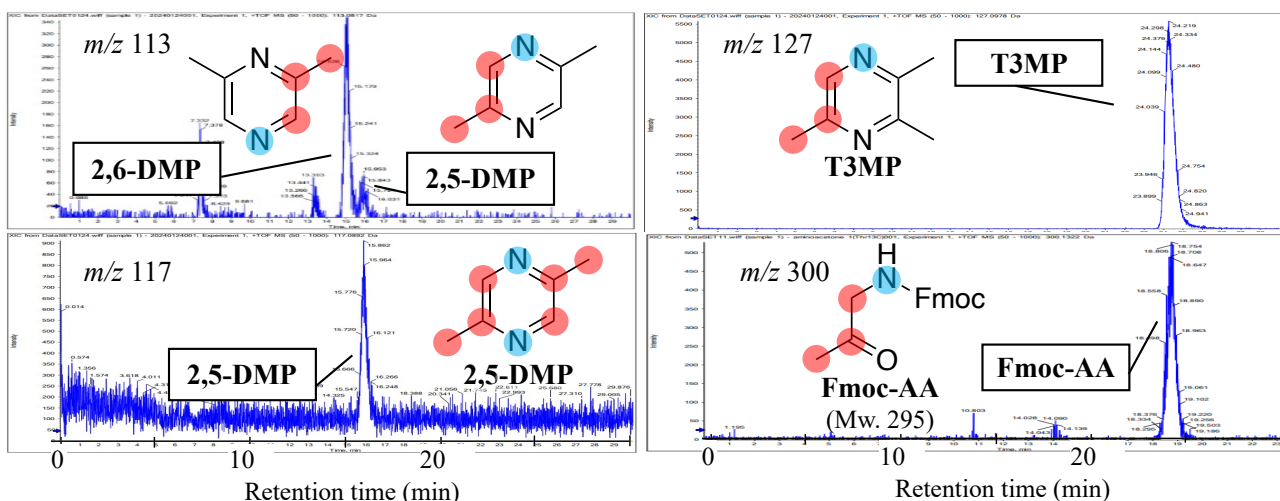


Figure 3. Ion chromatogram at  $m/z$  113, 117, 127, and 300 of the culture of *B. subtilis* prepared with L-threonine- $^{15}\text{N}$ ,  $^{14}\text{C}_4$ .

### 納豆におけるピラジン類の生成とスレオニン、アミノアセトン生成の関係

最後に、納豆においても液体培養と同様に、納豆菌によるスレオニンの代謝がピラジン類の生成に関連することを検討するため、煮沸した大豆で納豆菌を培養し、生菌数、ピラジン類、スレオニン、アミノアセトンの変化を調べた (Figure 4)。納豆菌は培養開始から 24 時間後に定常期に達した (Figure 4A)。スレオニンおよびアミノアセトンは納豆菌が十分に増殖した 24 時間以降に増加し始めた (Figure 4C, 4D)。2,5-DMP および T3MP は、スレオニンおよびアミノアセトンの増加に続いて生成した (Figure 4B)。このことから、納豆においても、納豆菌によるスレオニンの代謝がピラジン類の生成と関連することが示された。

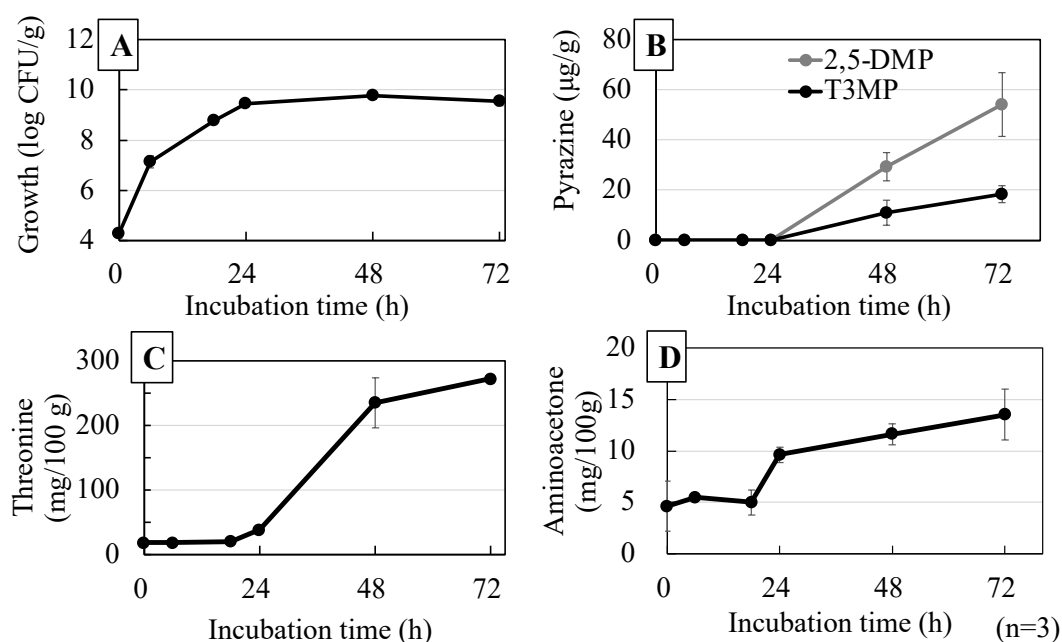


Figure 4. Growth of *B. subtilis* (A) and change in pyrazine (B), threonine (C), and aminoacetone (D) in *natto* (n=3).



## 要約

納豆の香気成分としてピラジン類である 2,5-ジメチルピラジン (2,5-DMP) および 2,3,5-トリメチルピラジン (T3MP) があげられる。その生成には納豆菌とスレオニンが関わっていると考えられるが、その詳細な生成機構は不明である。ここでは、納豆における 2,5-DMP および T3MP の生成と、納豆菌のスレオニンの代謝との関連を調べた。はじめに、スレオニンとペプトンを添加した最少培地で納豆菌を培養したところ、納豆菌の増殖に伴いスレオニンの量は減少し続け、納豆菌の生育が定常期に達した後にスレオニンの代謝物であるアミノアセトン、ピラジン類が生成した。スレオニンまたはグルタミン酸、セリンを添加した最少培地で納豆菌を液体培養した結果、スレオニンを添加した場合のみ、2,5-DMP、T3MP とともに生成した。続いて、L-スレオニン- $^{15}\text{N}$ ,  $^{14}\text{C}_4$  を添加した最少培地で納豆菌を培養した結果、 $^{15}\text{N}$  および  $^{14}\text{C}$  は、2,5-DMP の環の半分または分子全体、T3MP のメチル基を一つ持つ環の片側、アミノアセトンの分子全体に取り込まれた。すなわち、納豆菌の液体培養において 2,5-DMP および T3MP は、スレオニンの代謝により、アミノアセトンを経由して生成したことが示された。煮沸した大豆で納豆菌を培養したところ、納豆菌の生育が定常期に達した後にスレオニンが増加し始め、続いてアミノアセトン、ピラジン類が生成した。本研究により、納豆において 2,5-DMP および T3MP の生成には、納豆菌によるスレオニンの代謝が関与していることが示された。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 タカノ農芸化学研究助成財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

## 文献

- Fujii, H. (1961) On the formation of mucilage by *Bacillus natto*. Part I. Factors affecting the formation of mucilage. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **36** (12), 1000–1004.
- Kimura, K. and Kubo, Y. (2017). Flavor development during natto fermentation. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **64** (7), 379–384.
- Larroche, C., Besson, I., and Gros, J. B. (1999). High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochem.*, **34** (6–7), 667–674.
- Shibamoto, T., Akiyama, T., Sakaguchi, M., Enomoto, Y., and Masuda, H. (1979). A study of pyrazine formation. *J. Agric. Food Chem.*, **27** (5), 1027–1031.
- Tsutsuura, S., Suzuki, S., Yamamoto, A., Noda, K., and Murata, M. (2022). Involvement of *Bacillus subtilis* var. *natto* in formation of 2,5-dimethylpyrazine and 2,3,5-trimethylpyrazine in natto. *J. Home Econ. Jpn.*, **73** (1), 39–49.
- Zhang, L., Cao, Y., Tong, J., and Xu, Y. (2019). An alkylpyrazine synthesis mechanism involving L-threonine-3-dehydrogenase describes the production of 2,5-dimethylpyrazine and 2,3,5-trimethylpyrazine by *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **85** (24) e01807–e01819.