

菌の能力を引き出す—枯草に納豆菌はいるのか?—

Bring out the ability of bacteria -Is there natto bacteria in the withered grass?-

角谷 奏樹^{1,2}、伊藤 春香^{1,3}、佐々木 珠美^{1,3}、佐竹 航太郎^{1,3}
KADOYA Soki^{1,2}, ITOU Haruka^{1,3}, SASAKI Tamami^{1,3}, SATAKE Koutarou^{1,3}

東北大学 探求型「科学者の卵養成講座」¹, 仙台市立仙台青陵中等教育学校², 宮城県仙台第二高等学校³
EGGS, Tohoku University¹, Sendai Seiryō Secondary High School², Sendai Second High School³

Corresponding Author's e-mail: soki.kadoya.f9@sci-eggs.net

(Received: 5 December 2023; Accepted: 20 September 2024; Released: 15 November 2024)

[要約]

糸引き納豆は室町時代より蒸し大豆を稲わらに包んで作られてきたが、これは付着している納豆菌の耐熱性胞子を利用したものである。身の回りの枯れ草から納豆菌 (枯草菌 *Bacillus subtilis*) の分離を試みた結果、枯草菌に加えセレウス菌 (*Bacillus cereus*) が確認された。単離された4株の枯草菌を市販の納豆菌と比較したところ、全ての分離株は蛋白質分解酵素、澱粉分解酵素を分泌していた。一方ダイスエキス-ショ糖-グルタミン酸培地では、2株が納豆菌同様盛り上がったコロニーを形成したが、残り2株はシャーレ面に広がり糸引きは弱かった。これらの培養液を蒸した大豆に添加して37℃で24時間保温したところ、いずれも匂い、糸引きとも市販納豆から分離した納豆菌とほぼ同じ状態になった。シャーレ内でかき混ぜた糸に70%エタノールを添加することで、ほぼ同等の糸が作られていることを確認した。身の回りの枯れ草には納豆を作る能力のある納豆菌の胞子が存在すると同時に、納豆菌以外の有害な菌の胞子も存在していることが分かった。

[キーワード] 納豆菌, 枯草菌, セレウス菌, 胞子

Bacillus subtilis natto, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Spore

1. はじめに

糸引き納豆は、古くから食べられてきた大豆発酵食品であり、健康食品としても注目されている。納豆の起源は諸説あるが、日本の糸引き納豆は室町時代からといわれている。現在は蒸した大豆に純粋培養した納豆菌の胞子をかけ、40度で発酵させたのち冷蔵して発酵を止めた状態で販売されている。しかし、室町時代では蒸した大豆を稲わらで包み作られていた。伝統的な「納豆」はアジア圏でみられるが、日本のように稲わらを使って納豆を作る地域は少なく、バナナの葉やフリニウムウム、チーク、シダ、イチジクなどに由来する微生物で発酵させた納豆使用して作っている地域が多い。微生物学の発展により、稲わらに付着している納豆菌の耐熱性胞子を活用していることが明らかになると、大正時代以降は安全性の面から、稲わらそのものでなく、純粋培養した納豆菌を用いた納豆の製造が始まった。限られた納豆菌メーカー製の胞子を用いることは、安全性と引き換えに日本納豆の多様性が失われることになるが、大手メーカーを中心に現在でも納豆の粘り具合や香りなどの様々な付加価値を持つ納豆菌の探索されている。

本研究では、新たな性質を持つ可能性がある納豆菌が身近な枯れ草から分離できるのか、その分離した菌は安全なのかということを明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

(1) 納豆菌の培養と特徴の観察

納豆菌は「枯草菌のうち大豆を発酵して糸を引く株」である。その特徴を調べるため、市販の納豆から採集した納豆菌および枯れ草からの分離菌をスキムミルク寒天平板と大豆エキスショ糖グルタミン酸 (SSG) 寒天平板に植菌した。-20℃、15℃、25℃、37℃、40℃の5つの環境でそれぞれの培地を約46時間培養し、培地と温度によってどのようなコロニーの様子になるのかを観察した。

比較として大腸菌と表皮ブドウ球菌を両寒天平板にそれぞれを植菌し、37℃で26時間培養後観察した。

(2) 枯れ草からの菌の分離

枯れ草からの菌の分離は、殺菌した綿棒を枯れ草の表面にこすりつけて、その綿棒を使って培地に植菌する方法と、枯れ草自体を液体培地の中へ入れて増菌培養し、LB寒天平板に植菌する方法の2つを用いた。増菌培養では、LB培地に0.25%グルコースを加えたものを使用し、各試験管に5mlの培地と枯れ草を入れ、37℃で振とう培養した。

納豆菌の特性である、好気性であることを確かめるために、試験管の寒天培地 (高層培地) に菌を突き刺して培養した。また、納豆菌以外の菌 (自然界で採取した菌のうち黄色の菌と白い菌) が納豆菌に近いのかどうかを調べるためにグラム染色を行った。グラム染色のやり方は以下の通り。まず、スライドグラス上の三か所に一滴の水を置き、真ん中に分類・同定する被験菌を、両端に大腸菌 (陰性菌; 赤く染まる)、表皮ブドウ球菌 (陽性菌; 青く染まる) を標準として脇に置き、火炎固定したスライドグラスにA液 (0.2%ピクトリアブルー溶液・青色) を垂らし、一分間放置し塗抹面を下にして水洗、次に脱色液C (2%ピクリン酸アルコール溶液) を滴下後水洗し、さらに染色液B (0.25%サフラニン溶液・赤色) を滴下し後水洗した。余計な水分を除きカバーガラスを掛けて検鏡した。

(3) 16S リボソーム RNA 塩基配列による菌の同定

枯れ草から分離した菌を同定するため、16S リボソーム RNA の遺伝子をPCRで増幅し、増幅断片の塩基配列をAZENTA社 (GENEWIZ) に依頼し、決定した。そして国際データベースを用いて相同性検索を行った。

(4) 培地ごとの菌の性状の観察

枯れ草から分離した枯草菌と納豆菌をデンプン培地、スキムミルク培地、LB培地、SSG培地にそれぞれを植菌し、糸引きの有無やコロニーの様子などを観察した。デンプン培地ではヨウ素液を垂らし、デンプンが分解されているのかも確認した。

(5) 採集した菌を用いた納豆の作製と観察

Bacillus subtilis と同定された四株の菌と納豆菌を LB 培地で前培養し、蒸した大豆に植えて 37℃で 24 時間培養した。全てを薬さじで 100 回まぜ糸引きを比較した。その後 70%のエタノールを納豆にかけ、糸を可視化した。

(6) 培地の組成

- ・LB 寒天プレート（平板）：1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl pH = 7.0、1.5%寒天、121℃、15 分間オートクレーブ（液体の場合は観点を抜く）
- ・スキムミルク寒天プレート：LB 培地、1% スキムミルクに 1.5%寒天、110℃、10 分間オートクレーブ
- ・大豆エキス-ショ糖-グルタミン酸（SSG）培地：1.5%大豆ポリペプトン、1.5%ショ糖、1.5%グルタミン酸ナトリウムに 1.5 % 寒天、121℃、15 分間オートクレーブ
- ・デンプン寒天プレート（平板）：LB 培地、可溶性デンプンを 1%、1.5 %となるように 寒天、110℃、20 分間オートクレーブ。

3. 結果と考察

実験 1) 納豆菌の培養と特徴の観察

納豆菌をそれぞれスキムミルク培地と SSG 培地を用いて -20℃、15℃、25℃、37℃、40℃で培養した結果を表 1 に示す。

表 1 温度による納豆菌の生育

温度 時間	-20℃ 48 時間	15℃ 48 時間	25℃ 48 時間	37℃ 46 時間	40℃ 48 時間
スキム ミ ルク 培地	菌は生 えず、 培地が 縮まっ た	直径 1 mm 前後のコ ロニー 糸引きな し	直径 2、3 mmのコロ ニー 糸引きな し	直径 5 ～8 mm のコロ ニー 糸引き なし	直径 5～ 8 mmのコ ロニー 糸引き なし
SSG 培 地	菌は生 えず、 培地が 縮まっ た	ほとんど 糸は引か ず、コロ ニーは薄 く広がっ た	コロニー はやや盛 り上がり、 触ると糸 を引いた	シャー レから 滴るほ ど糸が できた	シャー レから 滴るほ ど糸が できた

スキムミルク培地で菌が生育したシャーレでは、菌の周りの濁りがなくなった。これは今回使用した培地中のスキムミルクを分解するのに十分な量の酵素が菌から分泌され、拡散したと考えられる。SSG 培地では 25℃以上の温度では盛り上がったコロニーを形成し、糸を引くようになった。スキムミルク培地で温度が高くなるほど大きなコロニーを形成しており、納豆菌の繁殖スピード 40℃までは高温になるほど速くなると考えられる。

次に糸引きは納豆菌だけの特徴なのかを調べるために 同じ培地と培養条件で大腸菌と表皮ブドウ球菌を培養したが、スキムミルクの分解はほとんど見られず、糸引きもなかった。このことからこの培地上での糸引きは納豆菌の特徴であることが分かった。

実験 2) 枯れ草からの菌の分離

実際に枯れ草からの菌の分離を試みた。採集場所は名取氏の田んぼ、仙台市青葉区内の道脇、青葉山の東北大

農学部周辺の枯れ草から菌を採取した。田んぼと道脇の枯れ草から採取したサンプルでは、さなざまな見た目の異なるコロニーが形成された。そこで、納豆菌と同様な盛り上がりシワのある特徴を持つコロニーを選び、新たな平板に植菌して純化した。

(例、図 1、図 2 で丸で囲まれているコロニー)

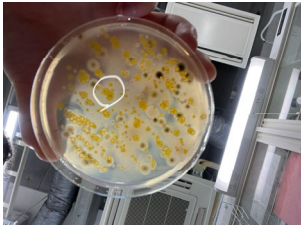


図 1 道脇の菌

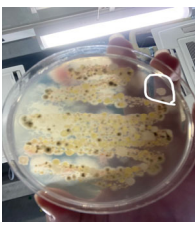


図 2 田んぼの菌

図 1、図 2 でピックアップした二つの菌のグラム染色を行った。その結果、道脇の枯れ草から分離した菌は青く染まりにくく、さらに細いものと短めの長方形が連なったような形の菌があり、少なくとも二種類の菌が分離しきれていないことが示された（図 3）。一方、田んぼの枯れ草から分離した菌は、青く染色されグラム陽性桿菌だと分かった（図 4）。形も長方形で納豆菌のような形をしていたため枯草菌である可能性が高いと考えた。

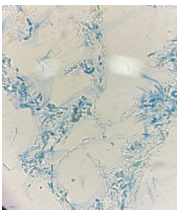


図 3 道脇の菌

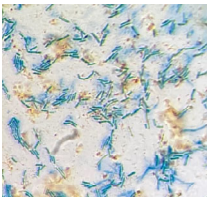


図 4 田んぼの菌

農学部周辺で採取した枯れ草は、穂から根までを 5 cm 程度ずつ、図 5 の左から①根(少し土付き)、①分けつしている部分、②～④は 5 cmごと、⑤穂のある部分の 6 つに区分した。それぞれを滅菌した 0.25%グルコース含有 LB 培地の入ったチューブに入れ、37℃で振とう培養した結果全てのチューブが濁った（図 6）。

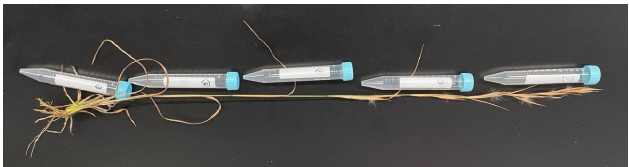


図 5 農学部の枯れ草

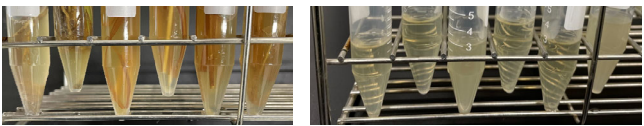


図 6 振とう培養した枯れ草

濁った培地を LB 寒天平板に塗布し、37℃で培養した結果、図 7 のようなコロニーが得られた。

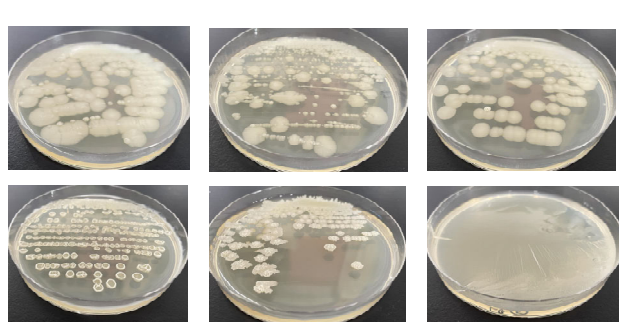


図7 図6の左をLB寒天培地に植菌
(上3つが左から①②、下3つが左から③④⑤)

図7の①、②は2種類以上の複数種の菌が、③は1種の菌が、⑤は菌が全体に生えた。④では緑が盛り上がる菌が、⑤ではしわのある菌が観察された。その中で特に大きいコロニーを作る菌に注目したところ、平らなコロニーを作るグループと盛り上がったシワができるグループに別けられた。

納豆菌は孢子を形成し、活動しやすい適切な環境になるまで高温にも耐えて生き延び、適切な環境になったら菌に戻ることができる。このように、枯れ草から採取した菌も孢子を作るかどうか調べるために、平らなコロニーを作る②の株とシワを持つコロニーを持つ⑤の株について、滅菌水に懸濁した菌を15分間75℃で処理後、LB寒天平板に植菌した。

その結果、それぞれの平板で元の菌と同じ性状を持つコロニーが確認されたことから、15分間75℃処理に耐性で、孢子を作ると考えられる。

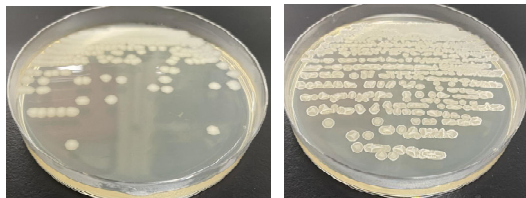


図8 熱処理した②株と⑤株の生育

実験3) 16S リボソーム RNA 塩基配列による菌の同定
田んぼからの分離菌、道脇からの分離菌と農学部からの分離菌①～⑤のそれぞれの菌を同定するために16S RNAの遺伝子をPCRで増幅し、その塩基配列を決定した。国際データベースを用いてCLUSTAL Wで解析した系統樹を図9に示した。

平らなコロニーを作る菌はピンクで示した「セレウス菌」の仲間、盛り上がったシワができるコロニーを作る菌は黄色の「枯草菌」と分類された。ちなみに、黄色い網掛けは市販の納豆菌である。今回単離した道端の草由来の菌はセレウス菌とその近縁種に分類された。一方、田んぼ由来の菌は枯草菌に分類された。農学部の枯れ草からは、部位によって枯草菌もセレウス菌も分離された。

セレウス菌も熱耐性の孢子形成菌であり、昔ながらの藁で作った納豆にはセレウス菌が混入する可能性が示唆された。セレウス菌には食中毒を起こすものがあることから、やはり純粋培養した菌を用いた方が安全ということが分かった。

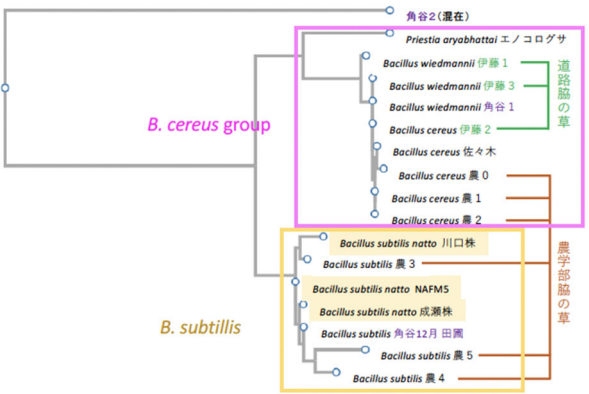


図9 16S rRNA配列による系統樹

実験4) 培地ごとの菌の性状の観察
これまでの分析で枯草菌に分類された農③、農④、農⑤、角谷株(田)について、種々の培地でのコロニーの性状を比較した(表2)。その結果、農③と農⑤、農④と角谷株(田)との間で性状が異なっていた。

表2 培地ごとの枯草菌				
	農③	農④	農⑤	角谷株(田)
デンプン培地	コロニーに盛り上がり水っぽい5mm程度の糸引き有り	乾いたコロニー	コロニーに盛り上がり水っぽい5mm程度の糸引き有り	短い糸引き有り
スキムミルク培地	クリアゾーンあり 糸引きなし			
LB培地	表面が乾いたような平らなコロニー			
SSG培地	植菌した部分以外にも広がりあり5mm程度の糸引き有り	植菌した線に集中して増殖コロニーに盛り上がり有り50cm以上の糸引き有り	植菌した部分以外にも広がり有り	植菌した線に集中して増殖コロニーに盛り上がり有り

ヨウ素液をかけてデンプン培地でのデンプンの分解能力を可視化したところ、農③、農⑤で分解能力があった。農③、農⑤の平板で見られた水っぽいものはデンプンを分解されて液状になったものかもしれない。スキムミルク培地でコロニー周囲にクリアゾーンが見られたことから、いずれの株もスキムミルクのタンパク質分解酵素の分泌が観察された。これらの酵素の存在はこれらの株が大豆タンパク質や澱粉を分解できることを示している。

実験5) 採集した菌を用いた納豆の作製と観察
図10で自家製納豆と市販の納豆を作成し、色や糸引き、匂いなどを観察した。糸引きは100回棄さじで混ぜた感触や粘りによる豆のまとまり方から判断した。豆の色はどれも市販の納豆菌と変わらなかった。匂いもどれも同じような納豆の匂いであったが、強さが違い、農④の

匂いが一番強かった。また、全ての菌で糸引きが見られた。市販の納豆の糸引きは強すぎず弱すぎず、一番混ぜやすかった。今回の分離株は糸引きの強い順に並べると、農④、市販の納豆、農⑤、角谷株(田)、農③となった。農④が一番強くてまとまりやすく、市販のものよりも強い糸引きを実現できていたことから、「よく糸を引く納豆」をつくれる菌株となる可能性がある。一方、農③と農⑤、田んぼ由来(角谷)株では糸引きはあるものの大豆が混ざるうちにボロボロとなって混ぜづらかった。

経験上、醤油をかけると納豆が混ぜやすくなると考え、生理食塩水をかけてみた。今回は発酵温度が 37 度と工場での 40 度以上と比べて低く、発酵が弱く市販納豆取より糸引きが少なかった影響か、全てのサンプルで糸が見えにくくなり、豆が分散して混ぜづらくなった。改めて納豆の糸が「水溶性」であることを実感した。

納豆の糸のような高分子は、DNA を取り出すときと同じ原理でエタノールで析出する。各サンプルに 70%エタノールをかけると、図 10 のように糸がすぐに白濁して肉眼でははっきりと見えるようになり、全ての菌が糸を作り出す能力を持っていることが確認できた。



図 10 枯草菌を用いた納豆の作成

4. 結論

枯草菌の品種である納豆菌は中温から比較的高温(37℃～42℃)で旺盛に生育し、糸の原料であるショ糖とグルタミン酸が存在すると大量の糸を生産することが分かった。大豆は他の豆類に比べグルタミン酸を含むタンパク質が比較的多くて糖が少ないことから、納豆菌にとって糸を作りやすいと考えられる。枯れ草に付着している耐熱性胞子を作る「バチルス科」細菌には、ヒトに病原性を示すものがある。実際、農学部で採取した一本の枯れ草から「枯草菌」と病原性を持つ株がある「セレウス菌」が分離されたことから、昔ながらの枯れ草での納豆作りにはセレウス菌が混在する可能性があり、食中毒のリスクがあることが分かった。一方、枯れ草から分離して枯草菌と同定された四株はすべて蒸した大豆にかけて発酵させると納豆菌と同様に納豆を作るが、糸引きの強さが異なっており、市販納豆とは違う性質を持つ菌が存在する可能性が示された。

謝辞

本研究は東北大学 みらい型「科学者の卵養成講座」の支援のもとで実施されました。

引用及び参考文献

- 1) 横山智 納豆の食文化史、農山漁村文化協会 2021
- 2) 木村 幹、永井利郎、木村啓太郎 編 納豆の科学 建帛社 2008
- 3) 納豆の研究法 木村 幹 監修 納豆の研究法 恒星社厚生閣 2010
- 4) 木村啓太郎 納豆と微生物 モダンメディア 61 巻 11 号 26-32 2015
- 5) 東北大学農学部生物化学コース編 生物化学コース 学生実験書 2022