

原著論文

サトウキビからの納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*) の 分離と納豆製造

加藤志織¹, 小松明美¹, 伊部さちえ², 熊田薫²

¹つくば国際大学医療保健学部保健栄養学科

²つくば国際大学医療保健学部臨床検査学科

【要 旨】 納豆製造には、純粋培養の納豆菌が使用されている。我々は、サトウキビからの納豆菌の分離を試み、納豆製造が可能かを検討した。サトウキビの採取場所は4地点を選んだ。納豆菌を分離するために伝統的方法で納豆を作り、納豆菌を17株分離した。これらの株で納豆を製造後、外観などを指標とし評価を行った。コロニー形状の検査も行った。また生化学的な同定を行い、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) であることが確認できた。納豆ができないものは粘りが少なく、粘性物質を作らないことが考えられた。しかし、生化学的分類では *B.subtilis* であった。納豆と判断したものは、食感に多様性があることが分かった。サトウキビから納豆菌の分離ができたことから、他のイネ科の植物から納豆菌の分離ができる可能性が示唆された。納豆を作るのに適している納豆菌に関しては、実用化も可能だと考える。

キーワード: 納豆菌, 枯草菌 (*Bacillus subtilis*), 分離, サトウキビ

序 論

納豆に関しては今まで様々な研究が行われてきた。例えば、粘性物に関する研究(村松他, 1997)、柔らかく糸引きが良い納豆の研究(三星他, 2006)、製造法に関する研究(村松他, 2001)、イソフラボンの研究(伊部他, 2001)、フィブリン溶解能(熊田他, 1993)や抗菌作用(須見と大杉, 1999)に関する研究などがある。納豆は稲わらから分離された枯草菌の一種である納豆菌によ

り製造されており、これらの研究に使われる納豆菌は稲わらから分離された株のみが使われている。また、産業としての納豆の製造は稲わらから分離・純粋培養された納豆菌が使われている。

枯草菌は稲わらの他にも枯れた植物から分離することが知られていることから、稲わら以外からも枯草菌の一種である納豆菌を分離することが可能ではないかと考えられる。しかし、稲わら以外から納豆菌を分離するという実証的な研究は今のところ知られていない。稲わら以外から納豆菌を分離できれば、納豆菌の採取場所の選択肢を広め、より官能的・機能的に評価が高く、また、今までと異なる特性の納豆を製造できる可能性が期待される。

本研究では、稲わら以外の植物として同じイネ科であるサトウキビから納豆菌を分離するこ

連絡責任者: 加藤志織

〒300-0051 茨城県土浦市真鍋6-8-33

つくば国際大学医療保健学部保健栄養学科

TEL: 029-826-6622

FAX: 029-883-6056

E-mail: s-kato@tius.ac.jp

とを試み、納豆製造の可能性についても検討した。

材料と方法

サトウキビの採取場所と採取方法

納豆菌を分離するためのサトウキビは①沖縄県八重山郡竹富町小浜島、沖縄県石垣市の②八重山ヤシ群生地そば、③新石垣空港そば、④旧石垣空港そばのサトウキビ畑4地点で採取した(図1)。

材料となるサトウキビは、枯れて乾燥した葉の部分を取り、清潔な袋に入れ、実験室に持ち帰った。



図1. サトウキビの採取場所

①小浜島(沖縄県八重山郡竹富町小浜) ②八重山ヤシ群生地そば(沖縄県石垣市) ③新石垣空港そば(沖縄県石垣市) ④旧石垣空港そば(沖縄県石垣市)

納豆菌の培養方法

4地点から採取したサトウキビの葉は、両端をビニールひもで固く縛り、1分間沸騰水につけて殺菌を行った。24時間浸漬したミヤギシロメ大豆を123℃20分蒸煮し、殺菌したサトウキビの藁苞に50g充填し、中央をビニールひもで固く縛った(図2)。さらに、酸素の流通と湿度を維持するため、この藁苞をビニール袋に入れ、穴を空けて37℃で24時間培養した。



図2. サトウキビの苞の様子

サトウキビの両端をビニールひもで結び、サトウキビの中央に大豆を入れ、培養する前の苞の様子である。苞の作成方法は稲わらで納豆を製造する際と同様の方法で行った。

納豆菌の分離方法

4地点のサトウキビから作成した納豆からそれぞれ2粒を滅菌ピンセットで取り出し、0.85%滅菌生理食塩水9mLで十分に攪拌した。この液を10倍段階希釈法により 10^5 倍希釈し、希釈液0.1mLを普通寒天培地に滴下後、コンラージ棒を用いて塗布した。この普通寒天培地を37℃で24時間培養してコロニーを作成し、単独コロニーを得た。

次に4地点のサトウキビのコロニーをそれぞれ実体顕微鏡で観察し(図3)、納豆菌の可能性が高いと考えられるコロニーを白金線を用いて平板に移し、培養した。納豆菌の可能性が高い

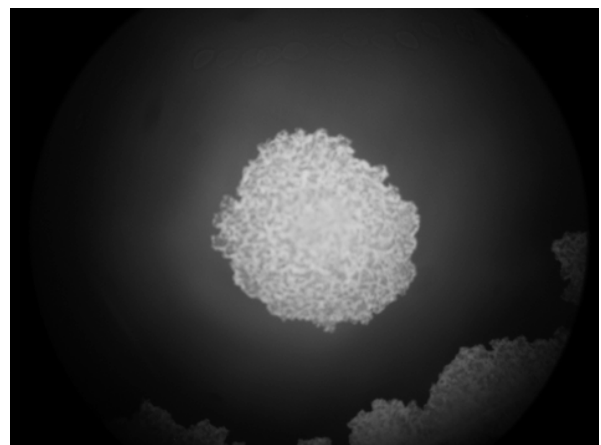


図3. 納豆菌を顕微鏡で観察した際のコロニーの様子
4地点のサトウキビから作成した納豆からコロニーを作成し、顕微鏡で拡大して観察した様子である。

かどうかの判断は、コロニーの形が不定形、目視または顕微鏡でコロニーを観察した際に盛り上がっている、コロニー表面の状態がザラついている、コロニー自体が糸を引くなどの今までの経験の知見によった。選定したコロニーには採取地点ごとにナンバリングを行い(表3)、それぞれ培養を行った。

納豆の製造

平板に培養した菌をブイヨン培地5mLに植え、37°C48時間、振盪速度160rpmで振盪培養を行った。培養後、2500rpm、10°C、5分間遠心分離した。リン酸緩衝溶液を5mL加え、同じ方法で再度遠心分離した。その後、リン酸緩衝溶液5mLで沈殿物を混合し、納豆製造の原菌液とした。

20°Cで24時間浸漬したミヤギシロメ大豆300gを浸漬し、123°C、30分オートクレーブで蒸煮した。滅菌シャーレに、蒸煮した大豆を約30gずつ入れ、分離した菌液を約0.8mLずつ大豆全体に散布した。その後、37°Cで24時間培養した。ただし、八重山ヤシ群生地そば3に関しては、他の株より生育が遅かったため、37°Cで48時間培養を行った。

納豆の評価方法

納豆の製造を行ったものを、以下の方法で評価した。

1. 官能評価

納豆の官能評価に対して、熟練した複数人による、主観的な官能評価を行った。評価項目として、外観(色、納豆らしさなど)、香り(納豆の香りであるか)、味(美味しさ、硬さ)、粘り(納豆を混ぜた時の糸引きはどうか)とした。粘りに関しては割り箸で10回転混ぜ、粘りを確認した。味、粘りに関しては、文章での表現が困難なため、「◎とても良い、○良い、△良くない、×とても良くない」の四段階で評価をした。

2. 生化学的同定

アピ50CHB/EメEDIUMを使用し、生化学的な同定を行った。今回使用したアピ50CHB/EメEDIUMは、*Bacillus* 及び関連菌種、腸内細菌科とビブリオ科に属するグラム陰性桿菌を同定する目的で使用される検査キットである。49種類の炭素源(表1)に対する分解能を確認することで同定が可能である。

表1. アピ50CHB/EメEDIUMの49種類の炭素源

アピ番号	炭素源	アピ番号	炭素源
0	コントロール	25	エスクリン
1	グリセロール	26	サリチン
2	エリスリトール	27	セロビオース
3	D-アラビノース	28	マルトース
4	L-アラビノース	29	ラクトース
5	リボース	30	メリビオース
6	D-キシロース	31	サッカロース
7	L-キシロース	32	トレハロース
8	アドニトール	33	イヌリン
9	β -メチル-キシロシド	34	メレジトース
10	ガラクトース	35	D-ラフィノース
11	D-グルコース	36	アミドン
12	D-フルクトース	37	グリコゲン
13	D-マンノース	38	キシリトール
14	L-ソルボース	39	β -ゲンチオビオース
15	ラムノース	40	D-ツラノース
16	ズルシトール	41	D-リキソース
17	イノシトール	42	D-タガトース
18	マンニトール	43	D-ブコース
19	ソルビトール	44	L-ブコース
20	α メト-D-マンノシド	45	D-アラビトール
21	α メト-D-グルコシド	46	L-アラビオール
22	N-アセチル-グルコサミン	47	グルコン酸塩
23	アミグダリン	48	2-ケトグルコン酸
24	アルブチン	49	5-ケトグルコン酸

アピ50CHB/EメEDIUMは、*Bacillus* 及び関連菌種、腸内細菌科とビブリオ科に属するグラム陰性桿菌を同定する目的で使用される検査キットである。49種類の炭素源に対する分解能を確認することで同定が可能となる。

3. コロニーの形状評価

分離したコロニーの形状を顕微鏡で観察し、形状の評価を行った。

結果

4地点のサトウキビから、小浜島4株、八重山ヤシ群生地そば3株、新石垣空港そば3株、旧石垣空港そば6株の合計で16株を分離できた。小浜島4は培養がうまくいかなかったため、分離を断念した。16株のうち、15株が *Bacillus*

subtilis であることが分かり、また、サトウキビの苞から納豆を製造することができた (図4)。納豆を製造できたと判断できたものは、小浜島3、旧石垣空港そば3、八重山ヤシ群生地そば2の16株中3株(12.5%)であり、実用化が可能であると判断できたものは小浜島3、旧石垣空港そば3の16株中2株(18.8%)であった。



図4. サトウキビから分離した納豆菌により製造した納豆
大豆表面の白い部分は納豆菌が作った菌膜である。

1. 官能評価結果

官能評価の結果は、表2となった。出来上がった物は様々な特徴のものであった。各評価項目の結果は、以下のようになった。

〈外観〉

外観に関しては、色が白いもの、茶色いものがあった。茶色のものについては色がまだらなものがあった。また、納豆らしいもの、納豆らしくないものがあった。

〈味〉

味に関しては、◎が1株、○が9株、△が1株、×が5株であった。大豆の味を強く感じるものや甘味があるもの、えぐみや苦味があるものなど、味に多様性があった。食べた瞬間に納豆らしいと感じるものでも、後味が良くないものも多くあった。×のものは、見た目や香り等も含め、食べるのが難しいと判断され、実際に味を調べることはできなかった。16株のうち、小浜島3と旧石垣空港そば3の2株は非常に良い味であった。

表2. 官能評価結果

株	外観	味(◎○△×)	香り	粘り(◎○△×)
小浜島1	白い	○えぐみが残る	納豆臭きつい、ツンとする	△
小浜島2	納豆らしくない	×食べられそうにない	大豆の香り	×ぼろぼろ
小浜島3	白い	◎甘く旨み有	納豆臭、軟らかい	◎
小浜島5	白い	○	納豆臭きつい、小浜島1と類似	△小浜島1と類似
八重山1	納豆らしい	○苦味、軟らかい	納豆らしい	△
八重山2	納豆らしい	○大豆の味	きつい、特有のえぐい臭い	○
八重山3	納豆らしい	○大豆の味	臭い弱め、やや嫌な感じ	△
新石垣空港そば1	まだら、大豆が茶色	○大豆の味強い 後味悪い	臭い弱め	◎一つになる
新石垣空港そば2	白い	○後味悪い	埃っぽい	△
新石垣空港そば3	茶色	○後味悪い	良くない、糞臭い	◎一つになる
旧石垣空港そば1	白い	×食べられそうにない	良くない、納豆じゃない臭い	△
旧石垣空港そば2	白い	△軟らかい、苦い	納豆臭、埃っぽい	○
旧石垣空港そば3	白い	○シンプル、悪くない	納豆臭	○
旧石垣空港そば4	薄茶色	×食べられそうにない	汗臭い	○
旧石垣空港そば5	真っ白のものが こびりついている	×食べられそうにない	納豆ではない	△ぼろぼろ
旧石垣空港そば6	真っ白のものが こびりついている	×食べられそうにない	納豆ではない	×

サトウキビから分離した16株から、納豆を製造し、官能検査を行った結果である。評価項目として、外観、味、香り、粘りを指標とし、評価を行った。味、粘りは、言葉での表現が困難なため、◎○△×の4段階で評価を行った。粘りは、割りばしで10回転かき混ぜ、評価をした。

〈香り〉

香りに関しても、多様性があった。納豆らしいと思えるものもあったが、明らかに納豆とは違うものや、納豆に似ているが臭いがツンとする、埃っぽいなど、不快な臭いのもあった。香りが良くないものは、味の評価においても△や×など良い評価ではなかった。

〈粘り〉

粘りに関しては◎～×の4段階評価を行ったが、◎が3株、○が4株、△が7株、×が2株であった。新石垣空港そば1と新石垣空港3は粘りの評価は◎であったが、粘着性が非常に強く、混ぜていると全で一塊になり、納豆とは少し粘り方が違うように感じた。

2. 生化学的同一性

アピ50CHB/Eメディウムによって同一性した結果(表3)、小浜島2以外は *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* (枯草菌) という結果となった。小浜島2に関しては、*Bacillus cereus* (セレウス菌) という結果であった。同一性結果が *Bacillus*

subtilis/amyloliquefaciens という表記になっている理由であるが、*Bacillus amyloliquefaciens* は元々 *Bacillus subtilis* に分類されていた経緯がある。*B. amyloliquefaciens* は、多量の amylase を産生することが知られているため(Welker and Campbell, 1967)、産業的利用の観点からも別菌種として取り扱うことが提案され、その結果本菌種が正式に分類された。しかし、*Bacillus subtilis* から *B. amyloliquefaciens* を遺伝子(16S rDNA 分析) 同一性においても明確に分離することができないことから、アピ50CHB/Eメディウムにおいて両菌種は区別されていない(Logan and Berkeley, 1984)。

アピ50CHB/Eメディウムの結果と官能評価との関連性について

各サンプルの49種類に対する発酵能はアピ50CHB/Eメディウムの結果、表4となった。表4のアピ50CHB/Eメディウムでの同一性結果と表2の官能評価結果は、関連が有るものと無い

表3. アピ50CHB/Eメディウムでの同一性結果(1)

株	種名	% I D
小浜島1	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.9%
小浜島2	<i>Bacillus cereus</i> 2	81.9%
	<i>Bacillus anthracis</i>	29.9%
	<i>Bacillus mycoides</i>	21.8%
小浜島3	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	98.8%
小浜島5	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	98.6%
八重山ヤシ群生地そば1	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	98.8%
八重山ヤシ群生地そば2	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.9%
八重山ヤシ群生地そば3	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	93.4%
新石垣空港そば1	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.1%
新石垣空港そば2	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	96.8%
新石垣空港そば3	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	94.8%
旧石垣空港そば1	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	75.5%
	<i>Bacillus firmus</i>	19.8%
旧石垣空港そば2	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.8%
旧石垣空港そば3	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	93.4%
旧石垣空港そば4	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	93.4%
旧石垣空港そば5	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.9%
旧石垣空港そば6	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	88.2%
	<i>Bacillus pumilus</i>	10.9%

サトウキビから分離した16株をアピ50CHB/Eメディウムを使用し、同一性を行った結果である。左の列が同一性した株名、真ん中の列が同一性結果、右の列が同一性確率を表す。

表3. アピ50CHB/EメEDIUMでの同定結果(1)

アピ番号	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
炭素源	0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC
B.subtilis/B.amlol.陽性率	0	77	0	0	84	91	56	0	0	0	12	95	98	87	1	1	1	65	95	86	0	83	29	70	80	100
小浜島1	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
小浜島2	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
小浜島3	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
小浜島5	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	±	-	-	±	+
八重山ヤシ群生地そば1	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
八重山ヤシ群生地そば2	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
八重山ヤシ群生地そば3	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
新石垣空港そば1	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
新石垣空港そば2	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
新石垣空港そば3	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
旧石垣空港そば1	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
旧石垣空港そば2	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
旧石垣空港そば3	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	±	-	-	±	+
旧石垣空港そば4	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
旧石垣空港そば5	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	±	+	+	-	+	-	+	+	+
旧石垣空港そば6	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+

アピ番号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
炭素源	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
B.subtilis/B.amlol.陽性率	86	97	98	23	48	90	88	58	0	62	78	79	1	52	50	0	0	1	1	1	0	7	0	0
小浜島1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
小浜島2	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
小浜島3	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
小浜島5	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
八重山ヤシ群生地そば1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
八重山ヤシ群生地そば2	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
八重山ヤシ群生地そば3	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
新石垣空港そば1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
新石垣空港そば2	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
新石垣空港そば3	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
旧石垣空港そば1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
旧石垣空港そば2	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
旧石垣空港そば3	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
旧石垣空港そば4	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
旧石垣空港そば5	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
旧石垣空港そば6	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

サトウキビから分離した16株を、アピ50CHB/EメEDIUMを使用し、それぞれの株が炭素源を利用しているかどうかを示している。

ものがあることが分かった。

〈同定結果と官能評価に関連性が有るもの〉

- ①小浜島2はエリスリトール(アピ番号22), アミドン(アピ番号36), グリコーゲン(アピ番号37)が陽性、イノシトール(アピ番号17), マンニトール(アピ番号18), ソルビトール(アピ番号19)が陰性で、他の株とは異なった炭素源の利用をしており、同定結果と官能評価が関連をしていた。
- ②新石垣空港1, 3はα-メト-グルコシド(アピ番号21)以外、全く同じアピの結果となっており、官能評価も似ていた。
- ③旧石垣空港そば5, 6は分離した株の中で唯一サリチン(アピ番号26), セロビオース(アピ番号27), β-ゲンチオビオース(アピ番号39)が陽性、イヌリン(アピ番号33)が陰性であった。両者は

実際に官能評価も似ていた。

〈同定結果と官能評価に関連性が無いもの〉

- ①小浜島5はリボース(アピ番号5), トレハロース(アピ番号32), イヌリン(アピ番号33)が陰性であったが、その3項目が陽性となっている、小浜島1に官能評価が類似しており、官能評価との関連性が無いようだった。
 - ②八重山3は、他のサンプルが陽性となっているものが少ない、D-キシロース(アピ番号6)、N-アセチル-グルコサミン(アピ番号22)、アミドン(アピ番号36)、D-ツラノース(アピ番号40)の4項目が陽性になっているが、官能評価は際立って特徴的でない、無難な結果であった。
- 〈官能評価で良い評価であった2株と同定結果との関連性〉
- 実用化が可能であると判断した、小浜島3と

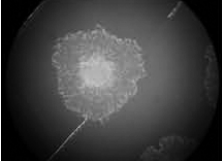

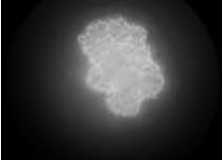


旧石垣空港そば3のアピ50CHB/EメEDIUMでの同定結果では、他の株の多くが共通して行っている炭素源の利用と同様の部分が多く、特徴が少なかった。この2株は、似ているわけではなく、異なる官能評価結果であった。小浜島3に関しては、甘さや旨みが強く、柔らかい納豆であった。一方、旧石垣空港そば3は癖がなく、シンプルな味わいで食べやすいという評価であった。しかし、旧石垣空港そば2と八重山2も、官能評価において、良い評価であった2株と同様の炭素源の利用をしているという結果であったが、旧石垣空港そば2は味に苦味があり、香りも埃のような不快な香りがした。八重山2は、味は悪くないが、香りがえぐい臭いや、臭い自体が強すぎるという官能評価であった。後者の2株の官能評価が良いものではなかったことから、アピ50CHB/EメEDIUMの結果と官能評価との関連性があるとは言い切れない。

3. コロニーの形状評価

分離した16株はコロニーの形状により大きく5種類に分類することができた(表5)。分類1は、コロニー中央が盛り上がり、周りに薄く広がるという特徴であった。分類2は、正円に近くて表面光沢がある特徴であった。分類3は、コロニー周辺が不定形で、白くなっているという特徴であった。分類4は、正円に近く透明、周りに毛綿状のものが見える特徴であった。分類5は、やや楕円形で、中心に円状のものがあ

る特徴であった。5種類の形状のうち分類1に属する株が一番多く、16株中8株(50%)であった。経験上、納豆菌の可能性が非常に高いと考えられる形状であった。分類2は16株中1株(6.3%)が該当した。分類3も分類1と同様に経験上、納豆菌の可能性が非常に高いと考えられる形状であり、16株中3株(18.8%)であった。分類4は16株中2株(12.5%)、分類5は16株中2株(12.5%)が該当した。

表5. コロニーの形状と官能評価との関連性

分類	コロニー形状	採取場所
1	 中央が盛り上がり、周りに薄く広がる	小浜島1 小浜島5 八重山ヤシ群生地そば1 八重山ヤシ群生地そば2 八重山ヤシ群生地そば3 旧石垣空港そば1 旧石垣空港そば3 旧石垣空港そば4
2	 正円に近くて表面光沢	小浜島2
3	 周りが不定形で白い	小浜島3 新石垣空港そば2 旧石垣空港そば2
4	 正円に近く透明、周りに毛綿状のものが見える	旧石垣空港そば5 旧石垣空港そば6
5	 やや楕円形で、中心に円状のものがある	新石垣空港そば1 新石垣空港そば3

コロニーの形状と納豆の官能評価との関連性について

分類1では、前述した、最も良い結果であったと評価した旧石垣空港そば3と、食べられそうにないと評価した旧石垣空港そば1と4が当てはまった。このように様々な特徴のものが含まれていた。

分類2は他とは異なる同定結果であった *Bacillus cereus*(セレウス菌)であり、小浜島2のみから分離された。食中毒菌として知られている細菌であり、納豆としては好ましくない。

分類3に関しては、官能評価において新石垣

空港2と旧石垣空港2は類似している特徴があったが、同じ分類3に属する、小浜島3と官能評価は異なっていた。この分類では、納豆になるものとならないものがあった。

分類4の2株は非常に類似した特徴を持っていたが、これらは納豆にはならなかった。

分類5の2株は非常に類似した特徴を持っていた。これらも納豆にはならなかった。

セレウス菌が同定されたことから、植物を煮沸した場合、基本的に枯草菌は生き残っているが、芽胞形成する細菌についても、多くはないが生存している可能性があることが分かった。

3つの評価方法を行い、納豆と判断できたものを比較すると、美味しいと感じるものもあれば、あまり美味しくないものもあった。外観や香りなども違いはあったが、食感的にも多様性があることが分かった。

小浜島2以外全て *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* であったが、全体の官能評価は様々であった。

考 察

サトウキビから納豆菌の分離ができたことから、他のイネ科の植物から納豆菌の分離ができる可能性が示唆された。アピ50CHB/EメEDIUMによって *Bacillus subtilis* だと判断された株の中には、官能評価において、香りや味が良くななく、納豆菌として使うには難しい仕上がりのももあった。納豆と評価できないものに関しては、粘りが少なく、粘性物質を作らないことが考えられた。

また納豆になりやすいものはコロニー形状が分類1と分類3であると考えられる。

枯草菌のうち官能的に納豆を作るものが納豆菌である。今回納豆菌と判断した株は小浜島3、旧石垣空港そば3、八重山ヤシ群生地そば2の3株であった。しかし、官能評価は科学的とはいえない。大きな指標は粘性物の産生であるが、その量には多様性があった。また、粘りの少な

い納豆も販売されるようになってきていることから、粘性だけで納豆菌であるかどうかは判断できない。しかし、食べた時のおいしさは味・香り・見た目・かたさなどによるので、おいしさを判断するためには、官能評価は重要である。

おいしさを生み出すものは大豆の成分と、納豆菌が生成する代謝産物による。本研究では、代謝と官能評価に部分的であるが一致が見られた。今回アピ50CHB/EメEDIUMによって、49種の糖の利用性を調べたが、これは納豆菌の代謝の一つの側面を反映するものなので、同じ *Bacillus subtilis* であっても官能評価は異なってくる部分もあったということが考えられる。今後は炭素源のみでなく、産生される臭い物質、味に影響を与えるアミノ酸、有機酸について調べることが重要である。同様に臭い物質についても検討する必要がある。

本研究で分離した納豆菌の中で、味や香りのよい納豆を作ることのできた納豆菌に関しては、実用化も可能であると考えられる。

今回の実験では納豆を食べて美味しいと感じるかどうかの官能評価、アピ50CHB/EメEDIUMを使用した生化学的評価、コロニーの形状をみる形状の評価を行ったが、納豆には様々な機能性があるので、今後はイソフラボンやフィブリン溶解能など、機能性についても調べていきたい。今後、分離した株についてより詳しく知るためには、遺伝子レベルで調べる必要もあると考えられるが、16SrDNA(RNA)の塩基配列では不十分であると考えられるので、より詳細な分類が可能となる MLST 法(木村,2006)などを用いて調べることは意義があるだろう。

参考文献

- 伊部さちえ, 熊田薫, 吉羽美穂子, 恩賀勉 (2001) イソフラボンアグリコン含有量の高い納豆製造. 日本食品科学工学会誌. 48:27-34.
木村凡 (2006) これからの細菌のゲノムタイピングとしての MLST 法. モダンメディア.

- 52:209
- 熊田薫，恩賀勉，星野尋志，友寄るみ子，小池和子（1993）フィブリン溶解能を高度に有する納豆菌の分離. 医学と生物学. 126:299-303
- 須見洋行，大杉忠則（1999）納豆および納豆菌中の抗菌成分ジピコリン酸. 日本農芸化学会誌 . 73:1289-1291
- 三星沙織，斎藤春香，松川みゆき，宮路陽子，田中直義，村橋鮎美，村松芳多子，渡辺杉夫，木内幹（2006）軟らかく糸引きの良い高齢者向け納豆の開発. 日本食品科学工学誌. 53:466-473
- 村松芳多子，勝股理恵，渡辺杉夫，田中直義，木内幹（2001）糸引納豆の製造法の改良. 日本食品科学工学誌. 48:277-286
- 村松芳多子，永井利郎，佐藤志津子，落合裕子，石村典子，伊藤義文，木内幹（1997）納豆菌の粘質物生産に及ぼす Phytone の効果. 日本食品科学工学誌. 44:812-815
- Googlemap.<https://www.google.co.jp/maps/@24.3912442,124.0451275,10.75z>（閲覧日：2017年9月26日）
- Logan, N. A., and R. C. W. Berkeley. (1984). Identification of Bacillus strains using the API system. *Journal of General Microbiology*. 130, 1871-1882
- N. E. WELKER and L. LEON CAMPBELL (1967) Unrelatedness of *Bacillus amyloliquifaciens* and *Bacillus subtilis*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 94:1124-1130

Original Article**Isolation of *Bacillus subtilis* natto from sugarcane and production of natto**Shiori Kato¹, Akemi Komatsu¹, Sachie Ibe², Kaoru Kumada²¹Department of Health and Nutrition, Faculty of Health Science, Tsukuba International University²Department of Clinical Laboratory Testing, Faculty of Health Science, Tsukuba International University**Abstract**

For the production of natto, pure-cultured *Bacillus subtilis* natto are utilized. In the present study, we attempted to isolate *B.subtilis* natto from sugarcane to assess whether natto production can be achieved using such bacteria. Sugarcane samples were collected at four different locations. To isolate *B.subtilis* natto, we made natto in accordance with a traditional technique and, as a result, successfully isolated 17 strains. Natto produced with these strains was subjected to evaluation using various indices, including appearance. The morphologies of their colonies were also examined. Finally, we biochemically confirmed these strains as belonging to *Bacillus subtilis*. Some strains failed to produce natto due to less gluey texture, which leads to the assumption that they cannot secrete a viscous substance. Nevertheless, they were *B.subtilis* from the biochemical perspective. The ones those were determined as natto varied in their texture. The successful isolation of *B.subtilis* natto from sugarcane suggests the possibility that *B.subtilis* natto may also be isolated from other poaceous plants. Strains that are suitable for natto production could be put into practical application in the future.

Keywords: Natto, *Bacillus subtilis*, Japanese traditional fermented food, isolate, sugarcane