

琉球地域の伝統産業「藍染料製造」に関わる微生物の特性

その2 沖縄産タデアイからの沈澱藍の製造に関わる微生物の特性

常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄

タデアイから製造される藍染料は、タデアイの乾燥した葉を3ヶ月ほどかけて堆肥状にした糞（スクモ）と呼ばれるものである。一方、琉球地域の藍染料は、主にリュウキュウアイの浸漬液から消石灰とともに沈澱させた泥藍である。泥藍は短期間に製造でき経済的評価は高い。そこで、沖縄産タデアイからの沈澱藍（泥藍）の製造を試み、その過程に関わる微生物の特性について検討を行った。タデアイ浸漬液の微生物は、浸漬初期に急増し、*Enterococcus* 属の乳酸菌が優占すると考えられた。タデアイ浸漬液には、pH7の中性で生育する微生物が多く存在したが、2～3日浸漬することによって、pH10のアルカリ性で生育する微生物の割合が増えた。タデアイ浸漬液からの泥藍の製造は、消石灰の添加量が多い程、回収される沈澱部（泥藍）の体積は増えたが、pH10.4以上では検出できる微生物数は極端に少なくなった。0.08%の消石灰を添加した場合、沈澱部に微生物が濃縮されることを確認した。

1 はじめに

タデアイ（タデ科）は、中国から奈良時代以前に伝わったとされ、亜熱帯の沖縄県から北海道まで広い地域で栽培されてきた藍植物であり、藍染料の原料として長期にわたり用いられてきた。しかし、19世紀末には、イン



図1 沖縄県うるま市で生育したタデアイ(小上粉)

ドアイから製造された沈澱藍を乾燥させた藍靛（アイジョウ）が輸入され、次いで20世紀はじめに、ドイツで開発された安価な化学合成藍（人造藍）が大量に入ってきたため、タデアイの生産量は急減する。現在、タデアイを藍植物として商業生産している地域は、徳島県吉野川流域と北海道伊達市に限られる。これらの地域では、タデアイの乾燥葉を3カ月ほど発酵して堆肥状した藍染料「糞（スクモ）」が製造されている。

一方、リュウキュウアイの新鮮な葉と茎の浸漬液から製造される藍染料の泥藍は、短期間で製造できるので、スクモに比べて経済的評価は高い。前報¹⁾では、リュウキュウアイ浸漬液から大規模に泥藍を製造している現場

で採取した浸漬液および泥藍の微生物の特性について述べた。また、リュウキュウアイからの泥藍とタデアイからのスクモとの違いについても微生物学的な考察を行った。そこで今回、沖縄本島（うるま市）で種から栽培したタデアイ（図1）を用いて、沈澱藍（泥藍）の製造を試み、その過程に関わる微生物の特性について検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 試薬および機器

微生物の分離および培養には、ペプトン（Becton, Dickinson and Company）、酵母エキス（Becton, Dickinson and Company）、酢酸ナトリウム（関東化学）、リン酸水素二カリウム（和光純薬工業）、リン酸二水素カリウム（和光純薬工業）、硫酸マグネシウム（関東化学）、モリブデン（VI）酸二ナトリウム二水和物（和光純薬工業）、タングステン（VI）酸ナトリウム二水和物（和光純薬工業）、硫酸マンガン（II）五水和物（ナカライテスク）、水酸化ナトリウム（和光純薬工業）、炭酸ナトリウム（和光純薬工業）、炭酸水素ナトリウム（和光純薬工業）、D-グルコース（和光純薬工業）、寒天（和光純薬工業）、塩化ナトリウム（ナカライテスク）を使用した。HPLC用移動相には、脱イオン水、硫酸（和光純薬工業）を使用した。HPLC分析用標準試薬には、L-乳酸（Sigma-Aldrich）、D-グルコース（和光純薬工業）を使用した。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析は、送液システム（Waters 600 controller）、オートインジェクター（Waters 717 plus Autosampler）、カラムオープン（Waters CHM）、脱気システム（Waters SDM）、屈折率検出器（Waters 410 Differential Refractometer）、紫外吸光度検出器（Shimadzu SPD-6AV）、イオン交換カラム（Bio-Rad

Aminex HPX-87H, 7.8 × 300mm) を用いて行った。

分光光度計は、UV/VIS Spectrophotometer V-550 (日本分光) を使用した。

2-2 タデアイの浸漬

タデアイは沖縄本島 (うるま市) で生育した小上粉 (品種名: こじょうこ) の葉を 2011 年 7 月 19 日に採取し、直ちに 4 倍量 (重量比) の滅菌した水道水に浸漬して重しを置き、上部をポリ塩化ビニリデン製フィルムで覆って 30℃ に保持した。

2-3 培地組成

基本培地の組成は蒸留水 1 L に対して、ペプトン 5g、酵母エキス 10g、酢酸ナトリウム 1.5g、リン酸水素二カリウム 1.5g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸マグネシウム 0.2g、モリブデン (VI) 酸二ナトリウム二水和物 0.5mg、タングステン (VI) 酸ナトリウム二水和物 0.5mg、硫酸マンガン (II) 五水和物 0.5mg、グルコース 20g とした。pH は水酸化ナトリウムと炭酸-重炭酸緩衝液を用いて調整した。平板培地は上述の培地に寒天 15g を加えて固めたものを用いた。

2-4 微生物の特性検討

リュウキュウアイやインドアイの浸漬液から製造される沈澱藍は、消石灰 (水酸化カルシウム) が添加されているのでアルカリ性である。また、沈澱藍は、pH10 以上の高アルカリ環境において藍染めに使用されている。そのため、タデアイの浸漬液やその沈澱藍の微生物の特性として、特に、高アルカリ環境で生育する微生物に注目して検討を行った。

微生物の特性は、タデアイの浸漬液および沈澱藍を滅菌水 (0.85% 塩化ナトリウム水溶液) で希釈し、pH 7 と pH10 に調整したグルコース、酵母エキス、ペプトン等を含む寒天平板培地に 0.1 ml 塗布して 30℃ で数日間培養した後、形成されたコロニーを計数することにより検討した。

2-5 微生物の分離

微生物を計数した寒天平板培地から出現したコロニーを液体培養したあと、再度、分離操作を繰り返して、分離菌株とした。

2-6 分離菌株の 16S rRNA 系統解析

寒天培地または液体培地で培養した分離株の菌体を prepGEM bacteria (ZyGEM) で処理してから遠心分離し、上清を分け取って DNA 粗抽出液とした。これを Bacterial

16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ) の PCR 用反応試薬およびプライマーミックス試薬と混合してサーマルサイクラー (BIO-RAD, MyCycler) で PCR 処理することにより、16S rRNA 遺伝子領域を増幅した。得られた PCR 産物は NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL) で精製し、チップ型電気泳動装置 (Agilent, Bioanalyzer 2100) で純度および収量を確認した。16S rRNA 遺伝子のうち解析した上流側約 500bp の塩基配列について、BLAST プログラムを用いてデータベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 上の配列と相同性検索を行い、細菌の種類を推定した。

2-7 乳酸、エタノールなど生産試験

分離菌株のコロニーから 1 白金耳をとり、pH10 の液体培地に接種して 1~3 日間培養したものを種培養液とした。これを液体培地 (pH10 または pH7) に対して 2% 量添加し、30℃ で 3~4 日間静置培養した。

3 実験結果および考察

3-1 タデアイから沈澱藍ができる過程と薬 (スクモ)

タデアイの葉に含まれる藍染料の前駆体インジカンは、図 2 に示すような化学変化を受ける。葉の浸漬によりインジカンあるいはインドキシルとして抽出された後、消石灰の添加と同時に空気酸化されて、インジゴに変化して沈澱藍となる。

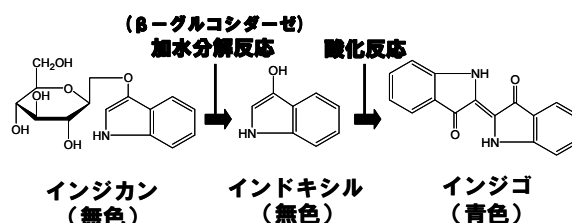


図 2 タデアイから沈澱藍までの化学変化

タデアイの新鮮な葉 (生葉) の浸漬液は、リュウキュウアイの場合²⁾と同様に、発酵にともなって浸漬液が濁って青緑色になる。しかし、乾燥したタデアイの葉を浸漬しても、濁りも少なく (微生物の増殖はほとんどなく) 薄茶色になるだけである。

このことから、藍植物の種類にかかわらず、沈澱藍の製造には新鮮な葉や枝を使用することが必要であることがわかる

一方、タデアイの葉では、乾燥中にインジカンが β-グルコシダーゼの作用によりインドキシルを経てインジゴに変換される。しかし、乾燥後のタデアイの葉に含まれる不溶性のインジゴは浸漬によっても、浸漬液中に移動できない。そのため、葉の中で不溶化したインジゴを

藍染料として利用するには、スクモのように、植物成分を長期間かけて分解して、堆肥のような藍染料にしてインジゴ含量を高める必要がある。スクモには、泥藍の場合と異なり、pH 7よりもpH10でコロニー形成する微生物が100倍以上多く存在することをすでに報告した¹⁾が、スクモの製造過程では、藍染料の濃縮と同時に、好アルカリ性微生物の集積が行われていることになる。天然の藍染料であるスクモや泥藍にそれぞれ集積、濃縮された好アルカリ性乳酸菌は、藍染め液の中で藍成分のインジゴを効率的に還元するのに役立っているのだろうか。

著者らは、インジゴ還元能をもつことが知られている *Alkalibacterium* sp. や *Oceanobacillus* sp. をそれぞれ市販の泥藍、スクモから他の微生物とともに分離しているが、泥藍もスクモも製造直後のものでなく、それらの保管期間中に外から入り込んだ可能性もある¹⁾。

一方、泥藍およびスクモを用いた藍染め液からは、好アルカリ性乳酸菌の *Alkalibacterium* sp. がしばしば分離されてくる^{3,4)}。藍染の強弱よりも、むしろ高アルカリ条件 (pH10~pH11.5) における耐久力の違いによって集積されてきていると推察される。

また、*Alkalibacterium* spp. は沖縄県やタイ国の腐敗した海藻や海草、生魚や塩をした魚めに関わる微生物は、藍染料 (インジゴ) に対する還元能、塩を加え発酵したえびペーストなどの海産物から分離されており⁵⁾、海風や飛来した塩などにより、*Alkalibacterium* spp. が藍染め液に入ってくることもありうると思われる。

3-2 沖縄産タデアイ浸漬液の微生物

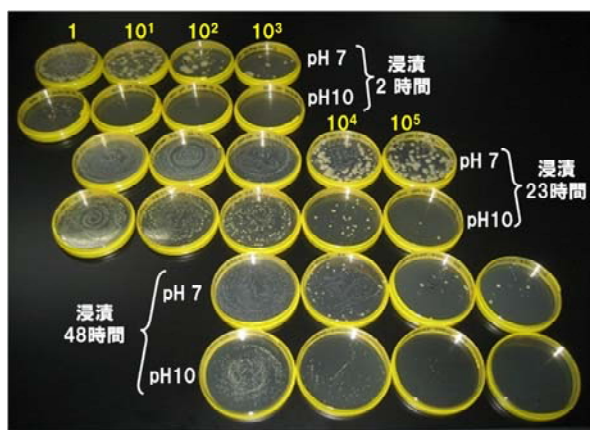


図3 pH7とpH10の寒天平板に好気条件で生育したタデアイ浸漬液からの微生物(培養30℃、2-3日)

図3には、2011年7月19日に沖縄本島うるま市で収穫したタデアイ (生葉) の浸漬液からの微生物のコロニーを示した。

また、表1にタデアイ (生葉) の浸漬液の微生物の特

性を示した。タデアイは収穫2時間後に県工業技術センターで滅菌した水道水に浸漬した。

表1 沖縄産のタデアイ浸漬液の微生物の特性

浸漬液		培養	Colony forming unit (c.f.u.) / ml		
時間 (h)	pH		pH 10	pH 7	pH 10/pH 7 (ratio)
2	5.8	好気	1.5 x 10 ³	8.5 x 10 ⁴	1/57
23	5.7	好気	1.1 x 10 ⁷	2.9 x 10 ⁸	1/26
48	5.6	好気	3.9 x 10 ⁷	1.0 x 10 ⁸	1/ 3
48	5.6	嫌気	5.3 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁸	1/ 2
64	6.1	好気	3.1 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁸	1/ 4
64	6.1	嫌気	6.1 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁸	1/ 2

浸漬時間が2時間の微生物は、タデアイの生葉に由来するものが主であると考えられる。pH10およびpH7の寒天平板上にコロニーを形成できる微生物の数 (c.f.u./ml) は、pH10よりもpH7で生育する微生物の方が多く存在していた。

pH10およびpH7の微生物数は、浸漬23時間後に、それぞれ3000倍、7000倍以上に増えており、微生物相も浸漬2時間とはコロニーを肉眼で観察しただけでも大きく変化していることが理解できた。浸漬48時間では、微生物数は同じレベルであるが、pH10で生育できる微生物数がやや増え、pH7で生育できる微生物数がやや減少したため、pH10とpH7の微生物数の比が小さくなった。浸漬64時間では、微生物数は浸漬48時間とほぼ同じであった。一方、嫌気条件では、pH10における微生物数が好気の場合に比べて多くなり、pH10とpH7の微生物数の比がさらに小さくなった。

3-3 浸漬液から調製した沈殿藍の微生物

固形物を分離したタデアイ浸漬液 (浸漬64時間) に消石灰 (水酸化カルシウム) を添加し、同時に激しく攪拌することにより藍染料を不要化させて沈殿藍を調製した。

表2 消石灰の添加による浸漬液からの沈殿藍の調製

Ca(OH) ₂ * 添加		pH	沈殿部容量 (ml)	Colony forming unit (c.f.u.) / ml		
mg	%			pH 10	pH 7	pH 10/pH 7 (ratio)
0	0	6.1	50**	3.1 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁸	1/4
40	0.08	9.2	5.0	1.9 x 10 ⁸	1.1 x 10 ⁹	1/6
90	0.18	10.4	7.5	0	9.0 x 10 ³	
238	0.48	12.4	9.0	0	0	

* 溶解度0.155g/100ml at 20℃ ** タデアイ浸漬液 (64h)

その結果を表2に示した。タデアイ浸漬液から回収される沈殿部 (沈殿藍) の体積は、消石灰の添加量が40mg (0.08%)、90mg (0.18%)、238mg (0.48%) と増えるに従って、5.0ml、7.5ml、9.0ml と増えた (図4)。沈殿藍の体積が大きいほど上澄み液の透明度は高かった。消石灰を0.18%添加した場合、溶液はpH10.4を示し、微生

物数は pH10 の寒天平板では検出できなくなり、pH 7 の寒天平板で 9.0×10^3 と極端に少なくなった。消石灰 0.48% を添加した場合、溶液の pH は 12.4 となり、pH10 および pH 7 の寒天平板で微生物が検出できなくなった。



図4 タデアイ浸漬液からの消石灰による泥藍の調製

一方、0.08%の消石灰を添加した場合、溶液の pH は 9.2 となり、沈澱藍の微生物数は、pH10 で 1.9×10^8 、pH 7 で 1.1×10^9 であった。このことから、沈澱藍に微生物が pH10 および pH 7 でそれぞれ 6.1 倍、10 倍に濃縮されていることが確認できた。

3-4 タデアイ浸漬液から分離した微生物の特性

タデアイの浸漬液から分離した微生物は、16SrRNA 遺伝子解析による簡易同定の結果、浸漬時間が 23 時間以上では、「植物性乳酸菌」とも呼ばれている *Enterococcus* sp. に属するものが多かった。*Enterococcus* sp. は市販の泥藍の製造現場からも多く分離されている¹⁾。一方、浸漬 2 時間の浸漬液から pH10 で生育する *Brachybacterium* 属の微生物が分離されている。

2% グルコースを含む pH10 の基本培地を用いて、浸漬液および沈澱藍からの分離菌株を 30℃、6 日間静置培養して、生成した有機酸を高速液体クロマトによる測定した結果を表 3 に示した。

タデアイ浸漬液および沈澱藍から分離した微生物の多くは、好アルカリ性あるいはアルカリ性耐性のヘテロ型の乳酸菌であることがわかった。これらの乳酸菌は、浸漬液や沈澱藍の腐敗防止にも効果があると思われる。

表3 タデアイ浸漬液からの分離菌株の有機酸生成能

浸漬時間 (h)	菌株	属名	有機酸 (g/L)		
			ギ酸	酢酸	乳酸
2	Ly-1	<i>Brachybacterium</i>	0	0.3	0
2	Lb-2		0	0	1.7
2	Mp-3		0.3	0.2	10.8
2	Mt-3		0.3	0.1	10.4
23	Mb-1		0.1	0.1	13.5
23	Mt-1	<i>Enterococcus</i>	0.1	0.1	13.6
64	My-1	<i>Enterococcus</i>	0.2	0.1	13.3
64	Mw-2	<i>Enterococcus</i>	0.2	0	13.6
64	Sc-3	<i>Enterococcus</i>	0	0	5.9
64 40mg-ppt	Mt-1		0.2	0.1	13.2
64 40mg-ppt	Sdc-3		0.2	0.1	13.5
64 40mg-ppt	Sw-5		0	0	12.8

4 おわりに

今回、沖縄産タデアイから沈澱藍の製造を試みたところ、リュウキュウアイと同様に、タデアイ生葉の浸漬・発酵液に消石灰を加えた後、攪拌酸化することにより沈澱藍（泥藍）が製造できることが明らかとなった。この成果は、タデアイからの藍染料の製造コストを引き下げるのに寄与すると期待される。

本研究は「バイオマスの微生物による処理技術の研究 (2009 技 005)」の一環として行ったものである。

参考文献

- 1) 常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄、琉球地域の伝統産業「藍染料製造」に関わる微生物の特性、沖縄県工業技術センター平成 22 年度研究報告書、13、1-6 (2011)
- 2) 常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄、琉球地域の伝統産業「藍染料製造」に関わる微生物の特性 (その 3) リュウキュウアイからの泥藍の製造に関わる微生物の特性、沖縄県工業技術センター平成 23 年度研究報告書、14、11-16 (2012)
- 3) 常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄、琉球地域の伝統産業「藍染め」に関わる微生物の特性、沖縄県工業技術センター平成 22 年度研究報告書、13、7-12 (2011)
- 4) I. Yumoto, K. Hirota, Y. Nodasaka, Y. Tokiwa and K. Nakajima: *Alkalibacterium polygonumreducens* sp. nov., an obligate alkaliphile that reduces an indigo dye. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 901-905 (2008)
- 5) M. Ishikawa et. al.: *Alkalibacterium thalassium* sp. nov., *Alkalibacterium pelagium* sp. nov., *Alkalibacterium kapii* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolated from marine organisms and salted foods collected in Japan and Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1215-1226 (2009)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。