

リュウキュウアイおよびタデアイからの沈澱藍の製造に関わる微生物

常盤豊*1、世嘉良宏斗

天然の藍染料として、経済的評価が高く、世界で広く使われている沈澱藍（泥藍）に注目して、リュウキュウアイおよびタデアイからの沈澱藍の製造に関わる微生物について調べた。リュウキュウアイからの泥藍の野外大規模製造では、浸漬液 1 ml 当たり $10^6 \sim 10^7$ 個の微生物が計数され、*Enterococcus* 属などの乳酸菌が多く分離できた。一方、タデアイからの沈澱藍の野外製造では、浸漬液 1 ml 当たり $10^7 \sim 10^8$ 個の微生物が計数され、*Enterococcus* 属の他にも、*Lactobacillus* 属、*Oceanobacillus* 属の乳酸菌も分離できた。また、両方の沈澱藍には、*Enterococcus casseliflavus* を主とする *Enterococcus* 属の好アルカリ性（アルカリ耐性）乳酸菌が多数を占めることが分かった。

1 はじめに

天然の藍染料としては、リュウキュウアイ（キツネノマゴ科）やインドアイ（マメ科）などの藍植物の浸漬液から染料成分（インジゴ）を沈澱させた沈澱藍（泥藍）が世界で広く使われている。琉球地域の藍染料は、リュウキュウアイを水に短期間浸漬して発酵させた液に消石灰を加えて、攪拌しながら染料成分（主としてインジゴ）を凝集沈澱させた沈澱藍（泥藍）である。一方、徳島県や北海道の藍染料は、タデアイ（タデ科）の乾燥葉を長期間（約3カ月）発酵して製造される菜（スクモ）である。

今回、藍染料として、短期間に製造できて経済的評価の高い沈澱藍に注目して、屋外にてリュウキュウアイおよびタデアイの浸漬液から沈澱藍の製造を行い、そこに関わる微生物について検討したので報告する。

なお、実験室内において、小スケール（2L 容ビーカー使用）でリュウキュウアイおよびタデアイから沈澱藍を作るのに関わる微生物については、すでに報告した。^{1,2)}

2 実験方法

2-1 培地組成および分析機器

微生物を培養するための基本培地の組成は、蒸留水 1L 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。

HPLC 分析は、送液システム（Waters 600 controller）、オートサンプラー（Waters 717 plus Autosampler）、カラムオープン（Waters CHM）、脱気システム（Waters SDM）、

RI 検出器（Waters 410 Differential Refractometer）、UV 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 藍植物の採取

リュウキュウアイは、沖縄県本部町山里で栽培されたものを 2013 年 6 月 27 日、7 月 1 日および 7 月 25 日の 3 回に分けて収穫したものを用いた。

タデアイ（小上粉）は、栃木県鹿沼市で栽培された小上粉という品種を 2013 年 8 月 11 日に収穫して用いた。

2-3 藍植物の浸漬と沈澱藍の製造方法

リュウキュウアイの浸漬と沈澱藍の製造は、沖縄県本部町山里の比嘉藍製造所の容量 7.5 トンの丸底型の藍壺 2 つを使用して 3 回行った。1 回目は、収穫したての新鮮なリュウキュウアイの葉と茎 400 kg を、山水を貯めておいた藍壺に投入して全容量 7.4 m³ とした。2013 年 6 月 27 日午前 11 時から 29 日午後 3 時までの 52 時間（平均気温 28℃）浸漬した後、葉と茎を取り除いた浸漬液に山水で懸濁させた消石灰 10 Kg を添加して、攪拌棒を使って数人で 30 分間激しく攪拌しながら藍染料を沈澱させた。2 回目は、1 回目に使用した藍壺の隣の同じ容量の藍壺を用いて、リュウキュウアイ 405 Kg を同様に山水に投入して 7 月 1 日から 7 月 3 日まで 52 時間浸漬を行った。3 回目は、1 回目に使用した藍壺に、リュウキュウアイ 251 Kg（水不足のために黄色や茶色に変色した葉は除く）を投入した後、藍壺の上部から 20 cm 程の水を排出してから、7 月 25 日から 7 月 27 までの 52 時間浸漬を行った。1 回目から 3 回目の沈澱した藍染料は、2～7 日間静置してから、同じ沈澱槽に移して、1 カ月毎に消石灰で pH10～pH11 に調整しながら、3 ヶ月間保存して、濃

*1 元任期付研究員

縮し沈澱藍とした。

タデアイの浸漬と沈澱藍の製造には、栃木県鹿沼市のニラ生産農家で栽培されたタデアイを2013年8月11日に収穫したものを使用した。同じ農家の敷地で容器A(220L容バケツ型黒色ポリ容器)、B(210L容バケツ型青色ポリ容器)およびC(105L容タライ型青色ポリ容器)に新鮮なタデアイ(葉と茎)をそれぞれ29.9Kg、28.4Kg、11.4Kg投入して、上部に重石を置き、2013年8月11日11時～8月13日15時までの52時間地下水で浸漬した。他の一つは、収穫したタデアイを茨城県土浦市に車で運び、容器D(105L容タライ型青色ポリ容器)にタデアイ(葉と茎)を12.8Kg投入して、上部に重石を置き、2013年8月11日18時～2013年8月14日8時まで水道水(長期間ポリ容器に保存)で浸漬した。葉と茎を取り除いたそれぞれ浸漬液に水で懸濁させた消石灰を0.1%の濃度になるように投入して、激しく攪拌しながら染料成分を酸化させて沈澱させた。2日後にそれぞれの容器の上澄み液を捨て、沈澱物を濃縮し、その4日後に沈澱藍を回収した。

2-4 微生物の特性検討

藍植物の浸漬液および沈澱藍の微生物の特性は、pH7およびpH10に調整したグルコース、酵母エキス、ポリペプトン等を含む基本培地を用いて行った。さらに具体的には、藍植物の浸漬液および沈澱藍(スラリー状)を滅菌した0.85%塩化ナトリウム水で希釈し、pH7とpH10に調整した寒天平板培地にそれぞれ0.1mlずつ塗布して30℃で数日間培養した後、形成された微生物のコロニー(集落)を計数することにより検討した。また、嫌気性微生物については、寒天平板を酸素吸収・炭酸ガス発生剤(三菱ガス化学)とともにアネロパックに入れて、密封して30℃で数日間培養してから、コロニーを計数した。コロニー数は、試料ml当たりのコロニー形成単位(c.f.u./ml)で表した。

2-5 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。

2-6 乳酸、エタノールなど生産試験

藍植物の浸漬液の有機酸や微生物の代謝産物はHPLCにより分析を行った。

3 実験結果および考察

3-1 リュウキュウアイ浸漬液および沈澱藍(泥藍)の微生物の特性

沖縄県本部町におけるリュウキュウアイ浸漬液からの泥藍(沈澱藍)の製造過程を、図1に示した。①新鮮なリュウキュウアイの葉と幹を水に二日ほど浸漬する。②2日ほど経過して、染料成分が植物体から浸漬液に出て来る。③植物体などの固形物を除いた浸漬液に0.1%程度の消石灰(水酸化カルシウム)を添加し、同時に激しく攪拌する。④浸漬液中のインドキシルが酸化されて、藍染料(インジゴ)ができて浸漬液が濃い青色に変色してくると攪拌は止めて、藍染料を凝集沈澱させることにより泥藍を調整した。



図1 藍植物の浸漬液からの泥藍(沈澱藍)の製造過程

表1に、リュウキュウアイ浸漬液および沈澱藍(泥藍)の微生物の特性を示した。リュウキュウアイの浸漬液と沈澱藍である泥藍の微生物の数(c.f.u./ml)を、pH7とpH10の寒天平板で調べた結果、浸漬液では、ml当たり $10^6 \sim 10^7$ レベルの微生物が存在していたが、pH7とpH10で計数できる微生物数は1回目から3回目ですれぞれに変動した。

寒天平板上に好気条件でコロニーを形成できる浸漬液の微生物の数は、リュウキュウアイを52時間浸漬した1

回目の場合、pH 7およびpH10でそれぞれ 2.8×10^7 、 2.3×10^7 であったが、51時間浸漬した2回目の場合、pH 7およびpH10でそれぞれ 1.4×10^7 、 4.9×10^3 となり、アルカリ性域で計数できる微生物の数が大きく減少した。さらに52時間浸漬した3回目の場合、pH 7およびpH10でそれぞれ 4.9×10^5 、 1.0×10^6 となり、中性域で計数できる微生物が減少した。

表1 リュウキュウアイの浸漬液と泥藍の微生物の特性

浸漬回数	試料	浸漬時間 (h)	pH	微生物の数 (c. f. u.) / ml	
				pH 7	pH 10
1	浸漬液	52	6.2	2.8×10^7	2.3×10^7
2	浸漬液	51	6.2	1.4×10^7	4.9×10^3
3	浸漬液	52	6.1	4.9×10^5	1.0×10^6
1-2混合	泥藍		8.2	7.5×10^5	4.1×10^5
1-3混合	泥藍		8.0	2.2×10^6	5.9×10^5

これは、リュウキュウアイの生育状態や収穫時の天候などが異なり、リュウキュウアイとともに浸漬液に持ち込まれる微生物の数や種類が変動することが一因でないかと考えられる。

また、屋外でのリュウキュウアイ浸漬液から計数できる微生物の数は、実験室内で行ったリュウキュウアイの浸漬液と比較して少ない傾向を示した²⁾。

3-2 リュウキュウアイの浸漬液から分離した微生物

表2には、1回目のリュウキュウアイの浸漬液から微生物を分離して、16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定の結果を示した。

浸漬液には、*Enterococcus* 属や *Lactococcus* 属などの乳酸菌が多く認められた。また、腸内細菌科の *Klebsiella* 属や *Kluyvera* 属の細菌も分離された。

表2 1回目のリュウキュウアイ浸漬液から分離した微生物

浸漬時間	菌株 No	微生物名 (pH7, 好気培養)	相同性 (%)	菌株 No	微生物名 (pH10, 好気培養)	相同性 (%)
52h	K91	<i>Klebsiella michiganensis</i>	99.1	K78	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5
	K93	<i>Kluyvera georgiana</i>	99.8	K80	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.2
	K96	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	98.0	K79	<i>Enterococcus garvieae</i>	98.5
	K88	<i>Lactococcus lactis</i>		K81	<i>Enterococcus garvieae</i>	98.3
		subsp. <i>lactis</i>	98.0			
	K95	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3			
	K92	<i>Enterococcus oryzendophyticus</i>	99.2			

表3には、3回目のリュウキュウアイの浸漬液から分離した微生物を示した。

近くの山からの湧き水を溜めた藍壺の表面の水には、リュウキュウアイを浸漬する前に、好アルカリ性（アルカリ耐性）の *Cellulosimicrobium* 属や *Microbacterium* 属の放線菌が認められた。

リュウキュウアイを1時間浸漬した後の上層水には、*Microbacterium* 属や *Pseudoclavibacter* 属の放線菌とともに *Pseudomonas* 属、*Staphylococcus* 属、好アルカリ性乳酸菌 *Exiguobacterium* 属など種々の細菌が分離された。

表3 3回目のリュウキュウアイ浸漬液から分離した微生物

浸漬時間	菌株 No	微生物名 (pH7, 好気培養)	相同性 (%)	菌株 No	微生物名 (pH10, 好気培養)	相同性 (%)
0h	V28	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	98.9	V24	<i>Microbacterium lateolum</i>	97.8
				V26	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	97.8
				V27	<i>Microbacterium arborescens</i>	98.8
1h 上層	V33	<i>Pseudomonas putida</i>	98.8	V29	<i>Pseudoclavibacter heivulus</i>	98.9
	V32	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>	98.3	V30	<i>Microbacterium arborescens</i>	98.8
	V31	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	98.2			
52h 上層	S01	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98.5	S08	<i>Pseudocitrobacter anthropi</i>	99.4
	S02	<i>Lactococcus taiwanensis</i>	98.1	S05	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	98.2
	S03	<i>Enterococcus xiangfangensis</i>	98.7	S06	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	98.0
	S04	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	97.9	S09	<i>Microbacterium radiodurans</i>	99.1
52h 全層				S07	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.6
	G79	<i>Weissella paramesenteroides</i>	98.0	S13	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	98.5
	S11	<i>Weissella paramesenteroides</i>	97.5	G81	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3
	S10	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98.8	S12	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3
				S14	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	97.5
				S18	<i>Enterococcus gallinarum</i>	98.3
	G78	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.2	G82	<i>Enterococcus faecalis</i>	98.6
	S17	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.2	S15	<i>Enterococcus faecalis</i>	97.9
				S19	<i>Bacillus hunanensis</i>	98.8
				S20	<i>Bacillus gibsonii</i>	98.3
			S21	<i>Bacillus gibsonii</i>	98.0	
			S22	<i>Bacillus gibsonii</i>	98.5	

52時間の浸漬を終えた浸漬液の上層には、*Lactococcus* 属や *Enterococcus* 属の乳酸菌とともに好アルカリ性の放線菌も認められた。さらに、リュウキュウアイの葉や茎などの固形物を取り除いて攪拌した浸漬液は、*Weissella* 属の乳酸菌や *Bacillus* 属の細菌も認められた。

すでに報告したが、実験室内でのリュウキュウアイの浸漬液からは、浸漬1~2時間では藍植物に由来する微生物として、*Enterococcus* 属の乳酸菌の他に、腸内細菌科の *Kluyvera* 属や *Citrobacter* 属の細菌、*Cellulomonas* 属や *Microbacterium* 属、*Isoptericola* 属の放線菌など種々の細菌を分離したが、浸漬19時間以降では *Enterococcus* 属や *Lactococcus* 属、*Lueconostoc* 属の乳酸菌のみを分離している²⁾。

3-3 リュウキュウアイの泥藍から分離した微生物

リュウキュウアイ浸漬液から製造、回収した泥藍を貯蔵してある瓶から試料採取を行い、分離した微生物の16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定の結果を表4に示した。

泥藍の中には、*Enterococcus* 属の乳酸菌、特に

Enterococcus casseliflavus と同定される乳酸菌が多く認められた。泥藍を長期間貯留した場合、胞子を作る嫌気性の *Clostridium* 属の細菌が増える傾向があった。

表4 リュウキュウアイの泥藍から分離した微生物

採取日	菌株 No	微生物名 (pH7で分離)	相同性 (%)	菌株 No	微生物名 (pH10で分離)	相同性 (%)
2013年 7月25日 (上層)	V41	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99.1	V37	<i>Brevundimonas olei</i>	98.3
				V34	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5
				V36	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.6
				V38	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.0
				V35	<i>Proteiniclasticum ruminis</i>	98.0
(中層)	V48	<i>Citrobacter youngae</i>	99.5	V42	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99.0
	V46	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.6	V43	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3
	V49	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5	V44	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3
				V45	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3
				V50	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	98.0
(下層)	V52	<i>Brevundimonas olei</i>	98.3	V51	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5
	V53	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.2			
	V54	<i>Enterococcus xiangfangensis</i>	98.7			
	V66	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3	V64	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.6
	V69	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5	V65	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.2
	V67	<i>Clostridium sporogenes</i>	98.3	V63	<i>Clostridium sporogenes</i>	98.5
	V68	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	99.0	V62	<i>Proteiniclasticum ruminis</i>	98.3
2013年 8月9日	G88	<i>Enterococcus gilvus</i>	98.5	G85	<i>Enterococcus malodoratus</i>	99.1
	G86	<i>Enterococcus mundtii</i>	98.9	G83	<i>Enterococcus lactis</i>	98.3
	G87	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.6	G84	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.2
全層 混合	G93	<i>Clostridium magnum</i>	94.3	G90	<i>Enterococcus thailandicus</i>	98.8
	G96	<i>Clostridium magnum</i>	93.2	G91	<i>Vagococcus fluvialis</i>	98.9
	G94	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	99.4	G89	<i>Proteiniclasticum ruminis</i>	98.2
	G95	<i>Clostridium aurantibutyricum</i>	98.5	G92	<i>Proteiniclasticum ruminis</i>	98.2

黒字：好気培養、赤字：嫌気培養

3-4 タデアイ浸漬液および沈澱藍の微生物の特性

タデアイの浸漬液と沈澱藍の微生物の特性を表5に示した。タデアイは、栃木県鹿沼市で栽培された小上粉という品種を用いた。

表5 タデアイ浸漬液と沈澱藍の微生物の特性

浸漬容器	試料種別	経過時間	pH	乳酸 (g/l)	酢酸 (g/l)	微生物の数 (c.f.u.) / ml	
						pH 7	pH10
A	浸漬液	52 h	4.6	0.98	0.38	8.8×10^7	$> 10^6$
	沈澱部	168 h	9.9			2.9×10^8	1.9×10^8
B	浸漬液	52 h	4.6	0.96	0.35	1.1×10^8	$< 10^5$
	沈澱部	168 h	8.9			1.2×10^8	7.5×10^7
C	浸漬液	52 h	4.5	1.14	0.36	4.5×10^7	2.4×10^4
	沈澱部	168 h	7.3			8.2×10^7	4.7×10^7
D	浸漬液	62 h	4.9	0.46	0.38	6.6×10^7	5.4×10^5
	沈澱部	86 h	9.9			3.8×10^8	3.8×10^8
	濃縮* 乾燥粉末**					1.6×10^7	1.3×10^7
						2.1×10^6	7.2×10^5

*水分81.3% **45mg/4.5ml滅菌水を1倍希釈(原液)とする。

黒字：好気培養、赤字：嫌気培養

浸漬液はやや酸性 (pH4.5~pH4.9) を示し、乳酸 (0.46~1.14 g/l) や酢酸 (0.35~0.38 g/l) を含んでいた。浸漬液と沈澱藍には、いずれも 1ml 当たり $10^7 \sim 10^9$ レベルの微生物が認められ、浸漬に使われた容器や場所の影響は認められなかった。しかし、浸漬液には、好気条件でアルカリ耐性を示す微生物が少なく、すでに報告した実験室内で沖縄産タデアイを浸漬した場合とは異なっていた¹⁾。一方、沈澱藍には、アルカリ耐性の微生物が比較的

多く存在することが分かった。

3-5 タデアイの浸漬液から分離した微生物

表6には、容器B(210L容バケツ型ポリ容器)および容器C(105L容タライ型ポリ容器)を使ってタデアイを浸漬した浸漬液から微生物を分離して、16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った結果を示した。

容器Bの浸漬液からは、浸漬2時間において、アルカリ耐性の *E. casseliflavus* を主とする *Enterococcus* 属の乳酸菌や *Exiguobacterium* 属の好アルカリ性乳酸菌が分離された。その他、腸内細菌科の *Enterobacter* 属、*Klebsiella* 属、*Cedecea* 属の細菌なども分離された。浸漬52時間では、嫌気条件で *Lactobacillus* 属の乳酸菌が分離された。

表6 タデアイ浸漬液(容器B,C)から分離した微生物

容器	浸漬時間	菌株 No	微生物名 (pH7で分離)	相同性 (%)	菌株 No	微生物名 (pH10で分離)	相同性 (%)		
B	2 h	L35	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3					
		L36	<i>Cellulomonas hominis</i>	99.1					
		L31	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3					
		L32	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3					
		L33	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3					
		L34	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3					
		L27	<i>Cedecea lapagei</i>	98.2					
		L28	<i>Exiguobacterium indicum</i>	97.7					
		L29	<i>Exiguobacterium indicum</i>	97.8					
		L30	<i>Enterococcus sulfureus</i>	98.2					
					Z63	<i>Klebsiella singaporensis</i>	99.5		
					Z64	<i>Enterobacter oryzendophyticus</i>	99.4		
			52 h	Z68	<i>Lactobacillus xiangfangensis</i>	99.2	Z65	<i>Lactobacillus xiangfangensis</i>	99.2
		C	2 h	G45	<i>Enterobacter oryzendophyticus</i>	99.1	G35	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5
G46	<i>Xanthomonas sacchari</i>			98.2	G37	<i>Enterococcus sulfureus</i>	98.8		
G48	<i>Acinetobacter soli</i>			99.1	G38	<i>Citrobacter youngae</i>	99.1		
52 h	G49		<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	99.5	G39	<i>Actinomyces oris</i>	96.9		
	G50		<i>Lactobacillus xiangfangensis</i>	99.2	G40	<i>Oceanobacillus ihyensensis</i>	98.6		
52 h + 消石灰	L40		<i>Enterococcus mundtii</i>	98.5	L37	<i>Marinilactobacillus piezotolerans</i>	99.8		
	L41		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.6	L38	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3		
				L39	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5			

黒字：好気培養、赤字：嫌気培養

一方、容器Cの浸漬液からは、浸漬2時間において、*Enterococcus* 属の乳酸菌の他に、*Citrobacter* 属や *Enterobacter* 属の腸内細菌科の細菌や *Acinetobacter* 属、*Xanthomonas* 属など種々の細菌が分離された。しかし、52時間後の浸漬液およびその浸漬液に消石灰を添加した浸漬液からは、*Actinomyces* 属の放線菌が分離された以外は、*Lactobacillus* 属、*Enterococcus* 属、*Marinilactobacillus* 属、*Oceanobacillus* 属などの好アルカリ(耐アルカリ)性乳酸菌であった。

沖縄産タデアイを実験室内で浸漬した場合、浸漬2時間では、*Brachy bacterium* 属の放線菌が分離されたが、浸漬23時間以降は *Enterococcus* 属の乳酸菌のみであった¹⁾。

表7には、容器D(105L容タライ型ポリ容器)を使ってタデアイを浸漬した浸漬液から、時間経過とともに試料採取を行い、分離した微生物の結果を示した。

ここでは、浸漬時間の経過にともなって、分離されて

くる微生物がどのように変化するかを注目した。

Enterococcus 属の乳酸菌は、浸漬1時間から浸漬62時間まで、すべてにおいて分離されているが、*E. casseliflavus* を除くと、種のレベルでは変化していることがうかがえる。*E. sulfureus* は浸漬1~24時間で出現し、その後は分離されていない。*Lactococcus lactis* は浸漬24時間~62時間、*Lactococcus garvieae* は38時間から62時間に出現している。*Lactobacillus* 属は62時間ではじめて出現している。*Leuconostoc mesenteroides* は38時間に限って出現している。

表7 タデアイ浸漬液（容器D）から分離した微生物

容器	浸漬時間	菌株 No	微生物名 (pH 7で分離)	相同性 (%)	菌株 No	微生物名 (pH10で分離)	相同性 (%)
D	1 h	L70	<i>Cedecea lapagei</i>	98.2	L42	<i>Microbacterium arborescens</i>	98.7
		L71	<i>Exiguobacterium indicum</i>	97.5	L44	<i>Enterococcus sulfureus</i>	97.2
					L46	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5
	14 h	L76	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5	L48	<i>Enterococcus sulfureus</i>	98.5
					L47	<i>Enterococcus faecalis</i>	98.2
	24 h	L78	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98.9	L49	<i>Enterococcus sulfureus</i>	98.3
					L51	<i>Enterococcus sulfureus</i>	98.6
	38 h	L80	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>sulonicum</i>	99.2	L52	<i>Lactococcus garvieae</i>	98.3
		L79	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	97.9	L54	<i>Lactococcus garvieae</i>	98.9
					L55	<i>Lactococcus garvieae</i>	98.6
	62 h	L81	<i>Lactobacillus brevis</i>	98.2	L53	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3
		L82	<i>Lactobacillus xiangfangensis</i>	99.0	L57	<i>Lactococcus garvieae</i>	98.6
		L83	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98.0	L56	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	97.9
	62 h + 消石灰	L84	<i>Enterococcus mundtii</i>	98.5	L58	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.1
					L61	<i>Enterococcus lactis</i>	98.1
				L60	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5	
				L62	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	97.7	

黒字:好気培養、赤字:嫌気培養

一方、*Exiguobacterium* 属の乳酸菌は浸漬1時間で分離されただけである。*Exiguobacterium* 属の乳酸菌は、容器Bにおいても、浸漬2時間でのみ分離されている。また、表3に示したリュウキュウアイの浸漬液においても、*Exiguobacterium* 属の乳酸菌は浸漬1時間でのみ分離されている。このことから、*Exiguobacterium* 属の乳酸菌は、浸漬液の中での生存競争に強くないように思われる。しかし、*Exiguobacterium* 属の好アルカリ性乳酸菌は、沖縄のサンゴ礁海域³⁾ やマングローブ域⁴⁾、また空气中⁵⁾ から分離されている。

種々の乳酸菌は、バクテリオシンと呼ばれるペプチドあるいはタンパク質の抗菌物質を生産することが知られている。*Lactococcus lactis* の多くの菌株は、ナイシンAやナイシンZ、ラクトコッシンQなどのバクテリオシンを生産することが知られている。

このように、乳酸菌にだけ注目しても、生育を互いに制御し、制御される世界が浸漬液のなかで展開されており、たいへん興味深い。

3-6 タデアイの沈澱藍から分離した微生物

表8には、タデアイの沈澱藍から微生物を分離して、

16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った結果を示した。タデアイの沈澱藍には、製造に用いた容器の形状や大きさ、あるいは場所などにかかわらず、*Enterococcus casseliflavus* を主とする *Enterococcus* 属の好アルカリ性（アルカリ耐性）乳酸菌が多数を占めることが分かった。

表8 タデアイ浸漬液から製造した沈澱藍の微生物

浸漬液容器	菌株 No	微生物名 (pH 7で分離)	相同性 (%)	菌株 No	微生物名 (pH10で分離)	相同性 (%)
B	Z70	<i>Enterococcus hermanniensis</i>	98.4	Z66	<i>Cellulomonas hominis</i>	98.9
	Z69	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3	Z67	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5
C	G52	<i>Cedecea lapagei</i>	98.5	G41	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	97.9
	G53	<i>Enterococcus mundtii</i>	98.5	G42	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3
				G44	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.2
				G43	<i>Enterococcus faecalis</i>	98.3
D	L86	<i>Enterococcus lactis</i>	98.1	L69	<i>Enterococcus mundtii</i>	98.6
	L85	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3	L64	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	97.9
				L65	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.3
				L68	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	97.5
				L67	<i>Enterococcus faecalis</i>	98.2
				L66	<i>Enterococcus faecalis</i>	98.3
濃縮 D*	N17	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.0	N15	<i>Enterococcus mundtii</i>	98.3
	N19	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5	N13	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.8
乾燥 D**	N25	<i>Enterococcus lactis</i>	98.1	N23	<i>Enterococcus mundtii</i>	98.2
	N24	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	97.7	N20	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.6
D**	N26	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.5	N21	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.9
	N27	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98.6	N22	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	98.2

黒字:好気培養、赤字:嫌気培養 *水分81.3% **天日による乾燥粉末

一方、容器Dの沈澱藍を天日乾燥により粉末化した場合、好アルカリ性（アルカリ耐性）微生物の数が表5に示したように相対的に減少したが、*Exiguobacterium* 属の別種の乳酸菌が分離されてきている。*Exiguobacterium* 属の好アルカリ性乳酸菌には、紫外線や乾燥に強い特性をもつ菌株もあるのでではないかと考えられる。最近、*Exiguobacterium indicum* が紫外線耐性であることが報告されている⁶⁾。

3-7 まとめ

伝統的な藍染めは、藍染料を好アルカリ性の微生物で還元することにより行われている。天然の藍染料として、経済的評価が高く、世界で広く使われている沈澱藍（泥藍）に注目して、リュウキュウアイおよびタデアイからの沈澱藍の製造に関わる微生物について調べた。

屋外におけるリュウキュウアイおよびタデアイからの沈澱藍の製造には、*Enterococcus casseliflavus* を主とする *Enterococcus* 属の好アルカリ性（アルカリ耐性）乳酸菌が重要であることが明らかになった。これらの乳酸菌は、乳酸やバクテリオシンなどの抗菌性物質を生産して、他の乳酸菌やグラム陽性細菌などの増殖を制御し、藍植物の腐敗を防止するのに役立っていることが考えられる。その結果、浸漬液の中に抽出されてくる藍成分（インジゴ）の前駆体である不安定なインジカンやインドキ

シルなどの物質が、微生物などの攻撃から守られているのではないかと考えられる。さらに、*E. casseliflavus*、*E. gallinarum*、*E. faecalis* など *Enterococcus* 属の乳酸菌は、エスクリン（クマリン配糖体）を加水分解することが知られているが、エスクリンと似た構造のインジカン（インドール配糖体）の加水分解によるインドキシルの生成にも積極的に寄与している可能性も考えられる。

リュウキュウアイの沈澱藍を用いた藍染め液からも *Enterococcus* 属の乳酸菌が分離されている⁵⁾が、多くの藍染め液に存在する *Alkalibacterium* 属⁵⁾の好アルカリ性乳酸菌や *Halomonas* 属⁵⁾の好気性細菌は、今回調べた沈澱藍からは見つかっていない。

一方、我々はすでにタデアイの乾燥葉を長期間かけて堆肥状にした藍染料のスクモには、*Oceanobacillus* 属の乳酸菌がいることを報告した^{7,8)}が、スクモを使った藍染め液からも *Oceanobacillus* 属の乳酸菌が見出されている⁹⁾。

スクモを使った藍染め液に存在する *Alkalibacterium* 属¹⁰⁾や *Amphibacillus* 属¹⁰⁾、*Halomonas* 属¹⁰⁾の微生物は、今のところ、スクモから見いだされていない。

沈澱藍やスクモに多く存在する *Enterococcus* 属や *Oceanobacillus* 属などの好アルカリ性（アルカリ耐性）乳酸菌は、藍建てのスターターとして重要と思われるが、その後は、通気条件、栄養源の種類や濃度など、藍染め液が維持管理される環境の違いにより、ある程度異なった微生物フローラが形成されるのではないかと考えられる。

4 おわりに

19世紀後半に化学染料が開発されるまで、人々は、土や動植物など自然のものを利用して衣類などを染めて生活してきた。中でも、藍染料の鮮やかな青色は、多くの人々を魅了してきたと思われる。

藍染料の歴史は、古くは、藍植物による生葉染めをした後に、青い沈澱物ができのに気づいたのが始まりではないかと考えられている¹¹⁾。また、生葉染めの時、木灰（手足や器の汚れ落としに使われた）を入れると麻や木綿も染まることを知り、藍染料を使った藍染めができるようになったのではないかと考えられる。

このことから、沈澱藍作りは、藍植物の伝播とほぼ同時だったのではないかと考えられる。沖縄で鳴藍と呼ばれていたタデアイも、伝播した時代にもよるが、古くは、沈澱藍として藍染めに使われていた可能性も否定できない。

しかし、沈澱藍は、藍植物から染料成分を抽出した後、酸化、沈澱を経て生産されるので、藍植物の種類により

その効率（藍染料の回収割合）に違いがでてくる。特に、染料成分が少ない藍植物では、ロスをできるだけ少なくして、藍染料を回収する方法（製藍法）が求められた。

その結果、染料成分を含んだ藍植物を乾燥させ、そのまま堆肥のように発酵させて嵩を減らした藍染料が開発された（この方法は、乾燥によりインジカンが安定なインジゴに変化する藍植物にだけ適応できる）。例として、6～16世紀に、英国やフランス、ドイツなどで藍植物ウオードから盛んに生産された玉状の藍染料や16世紀後半、徳島でタデアイから盛んに生産された藍染料スクモ、沖縄県宮古島のタデアイから作られた玉藍などが広く知られている。

なお、宮古島の玉藍の製法については、播磨や徳島のスクモとは別に、15～16世紀に中国やシャム、ジャワ、マラッカ、パタニなどの東南アジア諸国に行き盛んに交易していた琉球王国が、中国、ポルトガル、オランダ、スペイン、英国などの国を通じて、習得したのではないかと推測される。

図2に、生葉から沈澱藍および玉藍（スクモ）の製造過程の概略とそれぞれの過程における主な成分を示した。

図2の下段に示した玉藍の製造過程は、欧州やアフリカ諸国の玉藍作りの過程を示したものであるが、タデアイからの玉藍（スクモ）の製造過程は、後半の乾燥葉を堆肥化して玉藍にするところだけである。

沈澱藍と玉藍では、主な成分が異なっていることが分かる。沈澱藍ではインジゴの含量が高いが、玉藍ではインジゴの他に、ポリフェノールやクロロフィルなどの色素（染料）成分が多量に含まれていることが分かる。玉藍を水などで洗浄しないで、灰汁（媒染成分も含む）を使って藍染めを行うと、ポリフェノールやクロロフィルの草木染めも同時に行っていることになり、染色される色合いも違ってくるのが理解できる。

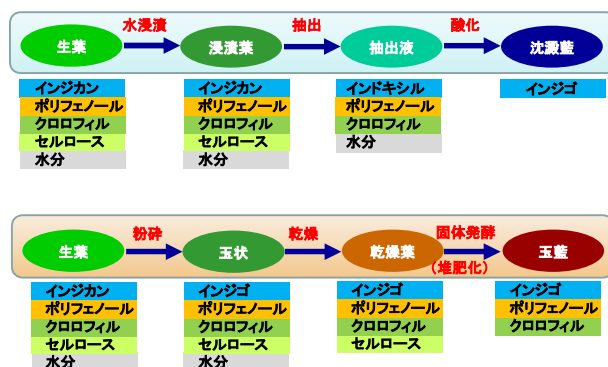


図2 天然の藍染料（沈澱藍と玉藍）の製造過程

本研究は「バイオマスからの高機能化学物質生産技術の実証 (2012 技 002)」の一環として行ったものである。(2000)

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「藍染め」に関わる微生物の特性 その 2 沖縄産タゲアイからの沈澱藍の製造に関わる微生物, 平成 23 年度沖縄県工業技術センター報告, 第 14 号, 7-10, (2012)
- 2) 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 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, 平成 23 年度沖縄県工業技術センター報告, 第 14 号, 11-16, (2012)
- 3) H. Yokaryo, Y. Tokiwa, Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L-(+)-lactic acid: J. Gen. Appl. Microbiol., 60, 270-275 (2014)
- 4) 常盤豊, 世嘉良宏斗, 市場俊雄, 沖縄の醗酵食品とマングローブ等の微生物, 平成 26 年度沖縄県工業技術センター報告, 第 17 号, in press, (2015)
- 5) 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 ー宮古島、久米島、沖縄本島の藍染め液についてー, 平成 24 年度沖縄県工業技術センター報告, 第 15 号, 13-21, (2013)
- 6) O.F. Ordonez, E. Lanzarotti, D. Kurth, M.F. Gorriti, S. Revale, N. Cortez, M. P. Vazquez, M. E. Farias, A. G. Turjanskie: Draft genome sequence of the polyextremophilic *Exiguobacterium* sp. strain S17, Isolated from hyperarsenic lakes in the Argentinian Puna, Genome Announc., 1 (4), e00480-13 (2013)
- 7) 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, 平成 22 年度沖縄県工業技術センター報告, 第 13 号, 1-6, (2011)
- 8) 常盤豊, 安村愛, 世嘉良宏斗, 市場俊雄, 楽隆生, タゲアイ由来の藍染料スクモの微生物の特性, 日本第 66 回生物工学会大会 (札幌) 要旨集, 241(3P-186), 2014-9-11
- 9) K. Anio, T. Narihiro, K. Minamida, Y. Kamagata, K. Yoshimune, I. Yumoto: Bacterial community characterization and dynamics of indigo fermentation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74, 174-183 (2010)
- 10) K. Aino, T. Narihiro, K. Minamida, Y. Kamagata, K. Yoshimune, I. Yumoto: Bacterial community characterization and dynamics of indigo fermentation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 174-183 (2010)
- 11) 井関和代, 藍植物による染料加工ー「製藍」技術の民族誌的比較研究, 大阪芸術大学紀要, 芸術 23, 51-62

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。