

## 琉球地域の伝統産業「藍染め」に関わる微生物の特性

常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄

芭蕉布、紅型、宮古上布、琉球緋、久米島紬などの伝統染織に広く使用されてきた染色法として藍染めがあり、藍染料としてはリュウキュウアイから製造された泥藍が使用されている。沖縄本島の芭蕉布の藍染め液には、泥藍の場合と違って、高アルカリ環境で生育する微生物が集積されてきていることが明らかとなった。分離した微生物は、*Enterococcus* sp., *Halomonas* sp., *Alkalibacterium* sp., *Alishewanella* sp., *Brevibacterium* sp.などに同定された。一方、タデアイからの藍染料スクモを使った藍染め液からは、*Alkalibacterium* sp.や *Amphibacillus* sp., *Bacillus* sp.などが分離された。沖縄本島のいくつかの藍工場の藍染め液では、藍染め液のアルカリ環境に適応した微生物が少なく、微生物による藍染めが十分に行われていないと思われる現状であることもわかった。

### 1 はじめに

琉球地域の伝統産業の一つである藍染めは、400年以上の歴史をもち、芭蕉布、紅型、宮古上布、琉球緋、久米島紬などの伝統染織に古くから用いられている。これらの伝統染織の藍染めに使われる藍染料は、現在、沖縄本島伊豆味でリュウキュウアイ（キツネノマゴ科）の枝葉の浸漬液から製造された泥藍（沈殿藍の一種）が用いられている。



図1 沖縄県国頭郡大宜味村喜如嘉の糸芭蕉

国の重要無形文化財に指定されている芭蕉布は、図1に示した糸芭蕉の繊維を利用した琉球地域の伝統的な織物である。今回、沖縄本島の芭蕉布の藍染めに関わる微生物の特性について検討し、徳島産の藍染料スクモを使った藍染め液と比較したので報告する。

### 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。D-及び L-乳酸の分析には、酵素試薬 F-キット (Roche Diagnostics) 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 藍染め液の採取

藍染め液としては、1974年に国の重要無形文化財に指定されている「喜如嘉の芭蕉布」の藍染め液を2009年8月1日と2010年7月17日に採取し、5℃で3日間密閉保存したものをを用いた。

その他、2009年8月以降、沖縄本島にある藍染め工房3カ所の藍染め液も採取した。

また、タデアイからの藍染料であるスクモ (徳島産) 由来の藍染め液として、2009年8月13日に真壁藍工房 (茨城県桜川市真壁町) の藍染め液を採取した。この工房では、アルカリ剤として灰汁の上澄み、栄養源として

フスマが使われていた。

### 2-3 培地組成

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。

### 2-4 微生物の特性検討

一般に、藍染めは pH10 以上の強アルカリ環境で行われる。そのため、藍染め液の微生物の特性は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、藍染め液を滅菌した 0.85 % 塩化ナトリウム水で希釈し、pH 7 と pH10 に調整した寒天平板培地にそれぞれ 0.1 ml ずつ塗布して 30 °C 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。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°C 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 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 白金耳を取り、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 pH 7) に対して 2% 量添加し、30 °C で 3~4 日間静置培養した。

## 3 実験結果および考察

### 3-1 藍染めのプロセス

藍染めによる藍染料 (インジゴ) の化学変化を図 2 に示した。インジゴは pH10~pH12 において微生物により



図2 藍染めによる藍染料 (インジゴ) の化学変化

還元されるとロイコインジゴのナトリウム塩となって水溶性になり、セルロース繊維の中に移動する。次に、セルロース繊維が酸素に触れるとロイコインジゴが酸化されて再び不溶性のインジゴとなりセルロース繊維に染着されて藍染めが完結することになる。

泥藍に含まれているインジゴを、アルカリ環境で微生物により還元して水溶性のロイコインジゴに変化させることを「藍建て」という。

### 3-2 芭蕉布の藍染め液に存在する微生物



図3 藍染め液を管理される人間国宝の平良敏子氏

藍染め液の微生物の特性は、沖縄本島の大宜味村喜如嘉にある芭蕉布会館で国指定重要無形文化財「芭蕉布」保持者 (人間国宝) の平良敏子氏が管理されているものを用いて検討を行った (図 3)。藍染め液は、芭蕉布会館

二階の階段を上った一角に荒焼き藍瓶（約70リットル）5個が設置されていた。5個の藍瓶は、藍染料として泥藍を使用しており、新しく藍建てしたものからくり返し染色に使用して古くなったものまでがある。それぞれの藍瓶は、夕方1回、底からかき混ぜられて、pHと温度が管理されている。「藍建て」の初期やその後の必要な時期に、pH調製のための苛性ソーダ（水酸化ナトリウム）、微生物の栄養源などとして水飴や泡盛が適量加えられる。

2009年8月1日に採取した藍染め液は、pH10.7~12.0のアルカリ性を示した。pH10の寒天平板上には、培養1日目から多くのコロニーが出現してきたことから、これらの微生物は藍染め液でも盛んに活動していることがうかがえた。図4に培養2日目の寒天平板を示した。

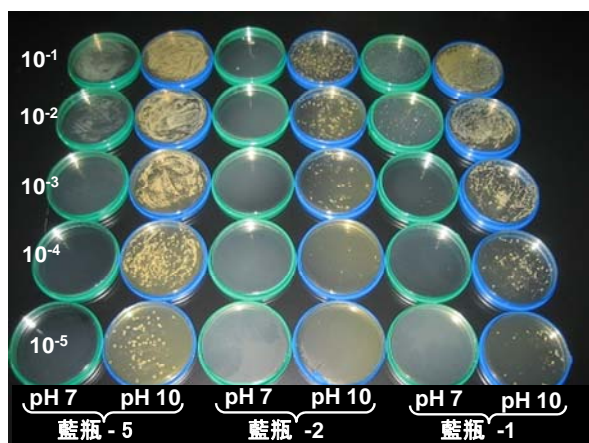


図4 希釈した藍染め液からの微生物コロニー(培養2日)

pH10の寒天平板上では、生育が非常に早い運動性の細菌が $10^5$ 程度存在した。藍染め液の微生物の特性を表1に示した。14日培養後のpH10の寒天平板上でコロニー形成した微生物の数は、 $4.6 \times 10^7 \sim 9.7 \times 10^7$ であり、三つの藍瓶でほぼ同じレベルであった。一方、pH7の場合の微生物の数は、pH10に比べて少なく、 $6.0 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^6$ と三つの藍瓶で大きな違いがあった。

表1 芭蕉布会館の藍染め液の微生物数

試料 No	藍染め液 pH	Colony forming unit (c.f.u.) / ml		
		pH 10	pH 7	pH 10 / pH 7 (ratio)
泥藍由来-1	10.7	$4.9 \times 10^7$	$8.2 \times 10^4$	598/1
泥藍由来-2	12.0	$4.6 \times 10^7$	$6.0 \times 10^3$	7670/1
泥藍由来-5	11.4	$9.7 \times 10^7$	$2.4 \times 10^6$	40/1
スクモ由来	10.8	$6.4 \times 10^6$	$1.6 \times 10^5$	40/1

以上のことから、藍染め液には、泥藍の場合と違って、強アルカリ環境で生育する微生物が集積されてきており、pH10の寒天平板にコロニー形成できる微生物が多く存在することが明らかとなった。

また、藍染料の違いを比較するため、タデアイからの藍染料であるスクモを使った真壁藍工房（茨城県桜川市真壁町）の藍染め液についても調べ、表1に示した。その結果、スクモ由来の藍染め液においても、pH10の寒天平板にコロニーを形成する微生物が多く存在していることがわかった。

### 3-3 藍染め液から分離した微生物の特性

図5には、芭蕉布会館の藍瓶-5から採取した藍染め液の希釈液をpH10、30℃で12日間好氣的に培養した寒天平板を示した。



図5 芭蕉布会館の藍染め液の微生物コロニー(pH10)

pH10の寒天平板から種々の微生物を分離し、16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った。その結果、芭蕉布会館の藍染め液から分離した微生物について、藍瓶-1からは、*Enterococcus* sp., *Halomonas* sp., *Pseudomonas* sp.など、藍瓶-2からは、*Alkalibacterium* sp., *Alishewanella* sp., *Halomonas* sp., *Nesterenkonia* sp.など、藍瓶-5からは、*Brevibacterium* sp., *Halomonas* sp.など、に同定されるものが比較的多く存在することが明らかとなった。増殖の速い *Halomonas* sp.は3つの藍瓶から分離できたが、同じ場所に並べた藍瓶で、同じ泥藍から調製されたそれぞれの藍染め液から分離される微生物株には、かなりの違いがあることが理解できた。この原因としては、藍染め液の時間経過にもなう有機酸などの成分変化や藍染めされる芭蕉布とともに入り込む微生物、潮風に乗り飛来してくる微生物、などの影響が考えられる。なお、*Alkalibacterium* 属は乳酸を生産することが知られているが<sup>1)</sup>、最近、*Alkalibacterium* 属の種々の菌株が海洋生物等から分離されている<sup>2)</sup>。

前報<sup>3)</sup>において、*Alkalibacterium* sp.が泥藍から、*Enterococcus* sp.が泥藍製造過程のリユウキュウアイ浸漬液から分離されたことをすでに報告している。泥藍とそれを使った泥藍由来藍染め液に存在する微生物の関係解



明は、泥藍の藍染めにおける役割(単に藍染料としてか、あるいは藍建ての微生物供給もあるのか)を明らかにするために重要と思われる。

一方、真壁藍工房のスクモ由来の藍染め液から分離した微生物には、*Alkalibacterium* sp.や*Amphibacillus* sp., *Bacillus* sp.に同定されるものが多く存在した。すでに、藍染料のスクモから分離された微生物として、*Alishewanella* sp., *Ornithinibacillus* sp., *Oceanobacillus* sp.などを報告した<sup>3)</sup>が、泥藍の場合と同様、スクモとスクモ由来の藍染め液に存在する微生物の関係解明は、スクモの藍染めにおける役割を明らかにするために重要と思われる。Ainoらは、北海道産のスクモを使った藍染め液(北海道伊達市)に*Alkalibacterium* sp., *Amphibacillus* sp., *Clostridium* sp., *Alcaligenes* sp.などが存在することを報告している<sup>4)</sup>。また、Ainoらは、研究室で調製した北海道産スクモ由来の藍染め液(培養3~4日)から*Halomonas* sp., *Bacillus* sp., *Oceanobacillus* sp., なども分離し、*Alkalibacterium* sp.に加えて、*Amphibacillus* sp.や*Oceanobacillus* sp.の菌株が新たにインジゴの還元能を持っていることを報告している<sup>4)</sup>。

表2には、2009年8月以降に芭蕉布会館も含め、沖縄本島の藍工房から採取した泥藍由来の藍染め液の微生物の特性を示した。表2のD-1, D-2, D-3は芭蕉布会館の異なる藍瓶からの藍染め液である。D-2の藍染め液のデータから、嫌気的な条件で生育できる微生物の数が好気的条件下で生育できる微生物と同じレベルで存在していることがわかる。

しかしながら、藍工房A, BおよびCの藍染め液については、pH10およびpH7で生育できる微生物の数が少なく、「藍建て」が不十分な状態であり、微生物による藍染料の還元がほとんど行われていないと推察された。

表2 沖縄本島の藍工房の藍染め液の微生物の特性

藍染め液	pH	Colony forming unit (c.f.u.)/ml			
		好/嫌気	pH 10	pH 7	pH 10 / pH 7 (ratio)
A 上層	12.5	好気	1.3 x 10 <sup>3</sup>	6.2 x 10 <sup>3</sup>	0.21/1
A 中層	12.4	好気	1.8 x 10 <sup>3</sup>	6.9 x 10 <sup>3</sup>	0.26/1
B	13.2	好気	1.5 x 10 <sup>5</sup>	6.2 x 10 <sup>3</sup>	24/1
C	12.4	好気	9.4 x 10 <sup>4</sup>	3.8 x 10 <sup>3</sup>	25/1
D-1	10.7	好気	2.7 x 10 <sup>7</sup>	6.0 x 10 <sup>4</sup>	450/1
D-2	12.9	好気	4.0 x 10 <sup>6</sup>	4.0 x 10 <sup>2</sup>	10000/1
D-2	12.9	嫌気	3.0 x 10 <sup>6</sup>	0	
D-3	11.0	好気	9.6 x 10 <sup>6</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>	96000/1

藍工房Aの藍染め液では、pH10で生育できる微生物の数が、pH7で生育する微生物よりも少なくなっており、

強アルカリ環境に適応した微生物相ではないことはあきらかである。

古くから「藍建て」は難しいと言われているが、日々の藍染め液の管理が最も重要と思われる。微生物の生育を阻害する乳酸が蓄積しないように、朝晩2回、攪拌し、必要ならば水飴や泡盛を添加することも大切である。

### 3-4 藍染め液の組成成分

表3 芭蕉布会館の藍染め液中の有機酸

藍染め液	試料 No	pH	乳酸 g/l	酢酸 g/l	ギ酸 g/l
藍染め液 D-1	10.7	2.3	4.9	0	
藍染め液 D-2	12.9	0.1	4.1	2.0	
藍染め液 D-3	11.0	0	7.9	1.4	
米粉液	1	2.7	5.7	1.9	0
米粉液	2	2.7	4.9	0	0

試料採取 2010年7月17日

表3に2010年7月に採取した藍染め液に含まれる有機酸をHPLCで測定した結果を示した。藍染め液を長期間にわたって使用していると、乳酸などの有機酸が蓄積して微生物の生育が阻害されることが考えられる。しかし、実際の藍染め液には最大でも2.3 g/lの乳酸が蓄積されているだけだった。このことから、藍染め液の中には、乳酸を分解処理できる微生物が存在することが考えられる。このように藍染め液には、藍染料を還元する微生物だけでなく、有機酸の濃度や酸化還元電位を一定の値に維持するのに寄与している微生物などが存在していると思われる。

また、表3には、染色後の芭蕉布を中和するために使用される米粉の発酵液1および2の有機酸についても示した。この米粉発酵液の有機酸は、従来、酢酸と考えられてきたが、分析の結果、乳酸が主成分であることが判明した。米粉の懸濁液では、ホモまたはヘテロ型の乳酸発酵が起っていると思われる。

### 3-5 藍染め液から分離した微生物株の有機酸生成能

表3から藍染め液には、乳酸や酢酸、ギ酸などの有機酸が存在することが明らかとなった。そこで、藍染め液からの分離菌株について有機酸の生成能を調べ、その結果を表4に示した。表中のMは、真壁藍工房のスクモ由来の藍染め液を示す。

*Enterococcus* sp.や*Alkalibacterium* sp.が乳酸を生成するが、*Halomonas* sp.や*Alishewanella* sp.は乳酸の生成能はほとんどないようである。

表4 芭蕉布藍染め液からの分離株の有機酸生成能

菌株	藍瓶	属名 (PCR同定)	有機酸 (g/L)		
			ギ酸	酢酸	乳酸(L型%)
AB123py	1	<i>Enterococcus</i> sp.	3.2	0.3	12.2 (99.0)
AB123br	1	<i>Halomonas</i> sp.		1.4	0
AB124c	2	<i>Alishewanella</i> sp.			0.1
AB125c	5	<i>Halomonas</i> sp.		0.9	0
AB125pk	5				0.2
AM127f	M	<i>Alkalibacterium</i> sp.	4.3	0.8	7.1

### 3-6 藍染めにもなる蛋白質や微生物の取り込み

図1において、藍染めによる藍染料（インジゴ）のセルロース繊維への染着について説明した。インジゴの分子は、還元・酸化による可溶化・不溶化だけでなく、分子間の水素結合により会合体となり高分子のような挙動もする（図6）<sup>5)</sup>。インジゴ分子は、還元・酸化や分子間

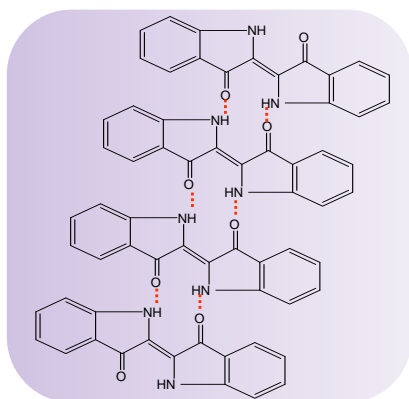


図6 インジゴの分子間水素結合

水素結合などにより、1nm以下から数十μmほどのコロイド粒子として藍染め液やセルロース繊維の中で挙動し、その環境に存在する藍植物や微生物などに由来する成分と相互作用して、セルロース繊維に染着していると考えられる。

例えば、藍植物や微生物などに由来する成分にアレルギーや感染症予防が期待される免疫賦活作用などの機能性があり、藍染料とともにセルロース繊維に固着できるようになると、藍染めによる「衣の健康」という夢も実現に近づく。

## 4 おわりに

琉球地域には芭蕉布、紅型、宮古上布、琉球緋、久米島紬、奄美大島紬など多くの伝統染織を生み育て、今なお、継続してさらに発展させようとする人々のエネルギーを感じる。これらの伝統染織に広く使われている染色法である藍染めに関わる微生物の特性を明らかにするため、今回、沖縄本島の芭蕉布の藍染めに関わる微生物の特性について検討した。

芭蕉布の藍染め液には、アルカリ環境に適応した種々の多くの微生物が活躍していることを明らかにすることができた。また、徳島産の藍染料スクモを使った藍染め液との共通点も見出すことができた。芭蕉布の藍染め液の微生物がどこからきたのかということについては、泥藍由来の微生物とも関連して、今後さらに検討を要する課題である。

しかし一方、沖縄本島のいくつかの藍工場の藍染め液では、藍染め液のアルカリ環境に適応した微生物が少なく、微生物による藍染めが十分に行われていないと思われる現状であることもわかってきた。これらの問題を解決するためには、毎日、藍染め液の管理をしっかりと行うことが重要と思われるが、管理の一部分を自動化して省力化することも一案である。さらに、藍染めに効果があるとわかった微生物を補助的に藍染め液に添加して、藍染め液の機能を早急に回復させることも可能と思われる。

酒造りは麴と酵母を利用して大きく発展してきたが、藍染めという発酵プロセスにおいても、有能な微生物を積極的に利用することにより、新たな飛躍を期待したい。

また、天然の藍染料を還元できる微生物は、化学合成されたインジゴの染色や脱色にも利用できると考えられる。2003年において、セルロース系繊維を染織するための染料は、世界で約50万トン消費され、その内、インジゴは約3.5万トン（7%）を占めている<sup>6)</sup>。微生物によるインジゴ還元が応用できる分野はたいへん大きい。さらに、微生物はアントラキノン系の染料（約8.5万トン）の還元にも作用できるか興味が広がる。

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) Y. Tokiwa, B. P. Calabia: Biological production of functional chemicals from renewable resources. *Canadian Journal Chemistry* **86**(6), 548-555 (2008)
- 2) 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)
- 3) 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)

- 4) 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)
- 5) 川人美洋子、安川涼子：天然藍で染めた色と合成藍で染めた色の比較、繊維と工業、**63**, 48-53 (2007)
- 6) M. Bozic, V. Kokol: Ecological alternative to the reduction and oxidation processes in dyeing with vat and sulphur dyes. *Dyes Pigments* 76, 299-309 (2008)

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。