

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

常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄

芭蕉布、紅型、宮古上布、琉球絣などの伝統染織に使用されている藍染料は、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。泥藍の製造に関わる微生物の特性を明らかにするため、リュウキュウアイ浸漬液および泥藍の微生物の特性を調べた。リュウキュウアイ浸漬液の微生物は、浸漬初期に急増するとともに *Enterococcus* 属などに属する好アルカリ性（アルカリ耐性）微生物の割合が大きくなった。浸漬液の微生物は、消石灰の添加により泥藍の中に濃縮されたが、消石灰の添加量が多すぎると泥藍の微生物が死滅することもわかった。さらに、不溶化した藍染料（インジゴ）に微生物が閉じ込められることも確認した。

1 はじめに

琉球地域には、藍植物としてリュウキュウアイ、インドアイおよびタデアイの3種が分布している。琉球地域の藍染料のほとんどは、リュウキュウアイ（キツネノマゴ科）から製造されている。収穫直後の新鮮なリュウキュウアイを浸漬して短期間発酵させた液に消石灰を加えて、激しく攪拌しながら染料成分（主としてインジゴ）を沈澱させた泥藍である。また、石垣島ではインドアイ



図1 沖縄県名護市伊豆味の林内のリュウキュウアイ

（マメ科）から同様な方法で泥藍が作られている。インドアイは石垣島、小浜島、竹富島などの八重山地域を北限とする熱帯性の藍植物である。宮古島では、泥藍の色調節のために、タデアイ（タデ科）を発酵させた藍玉（餅藍）と呼ばれる藍染料も造られ、宮古上布の染色に使われていた。

一方、徳島県や北海道の藍染料は、温帯地域に分布するタデアイの乾燥葉を3カ月ほど発酵して製造される薬（スクモ）である。

泥藍は短期間に製造できる利点があり、経済的評価は高いが、著者らは、泥藍の微生物の特性が一定でなく、不安定であることを報告した¹⁾。今回、泥藍が用いられ

る藍染め液への影響を考え、泥藍の製造プロセスと泥藍の微生物の特性との関係を明らかにするため、研究室でリュウキュウアイから泥藍を調製して検討したので報告する。なお、リュウキュウアイ（図1）は沖縄県名護市伊豆味地区の林内で栽培されたものを用いた。

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 リュウキュウアイの採取と浸漬

リュウキュウアイは沖縄県名護市伊豆味地区の林内で栽培されていたものを2011年10月22日(晴れ、平均気温24.9℃、降水量0mm)に採取し、5℃で2日間密閉保存したものをを用いた。

リュウキュウアイの茎と葉50gが入った1リットル容ビーカーに、滅菌した水道水200mlを加えて重しを置き、上部をポリ塩化ビニリデン製フィルムで覆って30℃で保持した。

2-3 培地組成

培地の組成は蒸留水1Lに対して、ペプト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(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を用いた。

2-4 微生物の特性検討

リュウキュウアイから製造される藍染料の泥藍は、pH10以上の高アルカリ環境での藍染めに使用される。そのため、リュウキュウアイの浸漬液や泥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。

微生物の特性を調べるために、グルコース、酵母エキス、ペプトン等を含む寒天平板培地をpH10およびpH7に調整して用いた。リュウキュウアイの浸漬液および泥藍を滅菌水(0.85%塩化ナトリウム水溶液)で希釈し、寒天平板に0.1ml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。

D-及びL-乳酸の分析は、酵素試薬F-キット(Roche Diagnostics)を用いて行った。

3 実験結果および考察

3-1 リュウキュウアイ浸漬液の微生物の特性

4倍量(重量比)の滅菌した水道水を加えて重しを置いたリュウキュウアイの浸漬液は、浸漬1時間後にpH6.2、19時間後にはpH5.7を示し、不透明な青緑色に変化した。図2に19時間後の浸漬液を示した。その後、



図2 浸漬19時間のリュウキュウアイ浸漬液

浸漬液は48時間と68時間でpH6.1と一定であり、濁りや色も顕著な変化は認められなかった。

浸漬液の微生物は、主としてリュウキュウアイと浸漬期間中の大気等に由来するものと考えられる。浸漬中に、リュウキュウアイの葉や茎の細胞から藍染料インジゴの元成分であるインジカンあるいはインドキシル(インジカンからβ-グルコシダーゼ作用によりグルコースが除かれたもの)が浸漬液に溶出してくる。さらに、2分子のインドキシルが酸化的に反応し青色不溶性のインジゴを生成して、浸漬液が青緑色を呈していると思われる。浸漬液の発酵過程では、リュウキュウアイ由来の細胞溶

解酵素やβ-グルコシダーゼが主に働いていると推測されるが、浸漬液中の微生物やその酵素がインジゴ生成に関係しているのかは不明である。

また、リュウキュウアイ浸漬液の表面に赤紫色の膜上になって浮いてくるのは、インジゴの構造異性体であるインジルピン（インジゴレッド）と考えられる。インジルピンは、1分子のインドキシルと1分子のイサチン（インドキシル酸化物）が反応して生成する。藍植物の浸漬液から藍染料を製造する場合、抽出されたインジゴ前駆体（インドキシル）の一部が酸化されて赤色のインジルピンを生成して泥藍に混入し、薬（スクモ）の色と微妙に異なることもある。

表1 リュウキュウアイ浸漬液の微生物の特性

試料 (浸漬時間)	pH	培養	Colony forming unit (c.f.u.) / ml		
			pH 10	pH 7	pH 10/pH 7 (ratio)
浸漬液(1h)	6.2	好気	6.8 × 10 ³	9.9 × 10 ⁴	1/15
浸漬液(19h)	5.7	好気	1.8 × 10 ⁷	1.4 × 10 ⁸	1/ 8
浸漬液(48h)	6.1	好気	4.5 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁸	1/ 4
浸漬液(68h)	6.1	好気	2.3 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁸	1/ 5
浸漬液(1h)	6.2	嫌気	8.6 × 10 ³	2.0 × 10 ⁴	1/ 2.3
浸漬液(19h)	5.7	嫌気	8.7 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁸	1/ 2.2
浸漬液(48h)	6.1	嫌気	7.3 × 10 ⁷	1.7 × 10 ⁸	1/ 2.3
浸漬液(68h)	6.1	嫌気	6.0 × 10 ⁷	1.0 × 10 ⁸	1/ 1.7

表1には、リュウキュウアイ浸漬液の微生物の特性を示した。浸漬1時間の浸漬液については、pH10 および pH 7 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、好気条件ではそれぞれ 6.8×10³、9.9×10⁴ であり、pH10 よりも pH 7 で生育する微生物の方が多く存在していた。これらの微生物は、リュウキュウアイの葉や茎に由来するものが主であると考えられる。

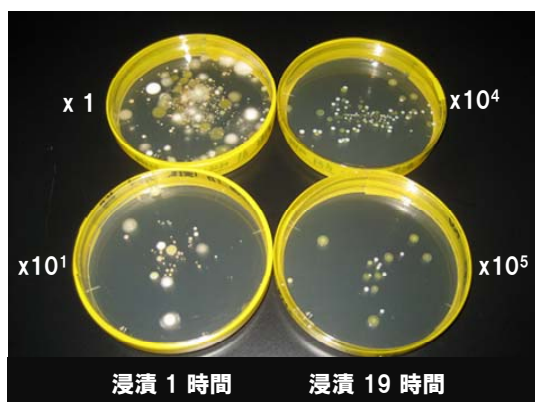


図3 寒天平板 (pH10、好気) に生育したコロニー

浸漬19時間後、pH10 および pH 7 の微生物数は、それぞれ 2600 倍、1400 倍と急増しており、微生物相も浸漬1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 (図3)。好気条件の場合、pH10 のコロニー数の増殖割合が大きいため、pH10 と pH 7 の微生物数の比が小さくなった。浸漬48時間以降の微

生物数は、浸漬19時間の場合とほぼ同じレベルであった。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 pH 7 の微生物数の比がさらに小さくなった。

表2 リュウキュウアイ浸漬液の微生物の特性 (pH調整)

試料 (浸漬時間)	pH	培養	Colony forming unit (c.f.u.) / ml		
			pH 10	pH 7	pH10/pH7 (ratio)
浸漬液(2h)	6.2	好気	2.1 × 10 ⁴	1.9 × 10 ⁵	1/ 9
浸漬液(20h)	6.1→10.2	好気	7.6 × 10 ⁷	3.2 × 10 ⁸	1/ 4
浸漬液(44h)	6.8→10.5	好気	1.4 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸	1/ 2
浸漬液(68h)	8.4	好気	3.3 × 10 ⁸	3.8 × 10 ⁸	1/ 1
浸漬液(2h)	6.2	嫌気	5.5 × 10 ⁴	1.3 × 10 ⁵	1/ 2
浸漬液(20h)	6.1→10.2	嫌気	8.5 × 10 ⁷	4.2 × 10 ⁸	1/ 5
浸漬液(44h)	6.8→10.5	嫌気	2.1 × 10 ⁸	3.6 × 10 ⁸	1/ 2
浸漬液(68h)	8.4	嫌気	3.6 × 10 ⁸	3.8 × 10 ⁸	1/ 1

表2は、リュウキュウアイを同じ条件で浸漬し、20時間後および44時間後に浸漬液のpHを人為的にそれぞれ pH6.1 から pH10.2、pH6.8 から pH10.5 に調整した浸漬液の微生物の特性を示した。この場合、pH10 の寒天平板上のコロニー数がやや多くなっており、pH調整の影響が認められた。

3-2 リュウキュウアイ浸漬液から分離した微生物

リュウキュウアイ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を行い、その結果を図4および図5に示した。

浸漬 1h, pH10, 好気 <i>Microbacterium radiodurans</i> <i>Cellulomonas denverensis</i>	浸漬 1h, pH10, 嫌気 <i>Kluyvera georgiana</i> <i>Cellulomonas denverensis</i> <i>Isoptericola variabilis</i> <i>Microbacterium</i> sp.
浸漬 19h, pH10, 好気 <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	浸漬 19h, pH10, 嫌気 <i>Lactococcus lactis</i>
浸漬 48h, pH10, 好気 <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	浸漬 48h, pH10, 嫌気 <i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus ureasiticus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> 浸漬 48h, pH7, 嫌気 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

図4 浸漬液から分離した微生物 (pH無調整)

図4は、表1に示した浸漬液から分離した好気性および嫌気性微生物について示した。浸漬1時間では、*Cellulomonas* 属、*Isoptericola* 属、*Kluyvera* 属、*Microbacterium* 属などに属す種々の微生物を分離することができた。これらは、リュウキュウアイの葉や茎に由来すると考えられる。しかし、微生物数が急増した19時間以降の浸漬液から分離できる菌株は、pH10 では *Enterococcus* 属や *Lactococcus* 属、pH 7 では *Leuconostoc* 属に属する乳酸菌に限られていた (図4)。

図5には、表2に示した浸漬液から分離した好気性微生物について示した。この場合、リュウキュウアイの浸漬液は、浸漬20時間および44時間後にpHを人為的にそれぞれpH6.1からpH10.2、pH6.8からpH10.5に調整

浸漬2h, pH7, 好気 <i>Citrobacter youngae</i> <i>Enterobacter cowanii</i>	浸漬2h, pH10, 好気 <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Microbacterium arborescens</i>
浸漬20h, pH7, 好気 <i>Enterococcus casseliflavus</i>	浸漬20h, pH10, 好気 <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus gallinarum</i>
浸漬44h, pH7, 好気 <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>	浸漬44h, pH10, 好気 <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>
浸漬68h, pH7, 好気 <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>	浸漬68h, pH10, 好気 <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>

図5 浸漬液から分離した微生物（pH調整）

されている。浸漬2時間では、*Citrobacter* 属、*Enterobacter* 属、*Enterococcus* 属、*Microbacterium* 属などに属す微生物を分離することができた。しかし、浸漬20時間以降、pH10およびpH7の両方の寒天平板から分離できた微生物は全て *Enterococcus* 属に属する乳酸菌であった。*Enterococcus* 属の乳酸菌は、中性からアルカリ性まで広い範囲で生育できる菌株が多いので、pH10とpH7の両方の寒天平板から分離できたと思われる。

藍染め液からしばしば分離され、藍（インジゴ）の還元能を有していることが知られている *Alkalibacterium* 属のような好アルカリ性乳酸菌（中性では生育できない）を優占させることができるかは今後の課題である。

3-3 浸漬液から分離した微生物の有機酸生成能

2%グルコースを含むpH10の基本培地を用いて、リュウキュウアイ浸漬液からの分離菌株を30℃、1~4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

表3 浸漬液から分離した微生物の有機酸生産能

分離海水	培養日数	グルコース	コハク酸	乳酸	酢酸	ギ酸 9/1
基本培地	-	23.0	0	0.3	2.5	0
<i>Cellulomonas</i>						
RB01-10K23	1	15.9	0	0	1.9	0.7
<i>E. casseliflavus</i>						
RA02-10K11	1	10.1	0	13.5	3.1	2.0
RA02-10K12	1	1.9	0	23.0	3.1	2.0
RA44-10K18	1	0.0	0	13.6	2.0	1.4
RA44-10K19	1	3.5	0	10.2	1.8	1.2
RA68-10K20	1	0.0	0	14.2	1.7	1.2
RA68-10K21	1	0.0	0	13.5	1.9	1.4
RA20-10K16	1	0.6	0	26.7	3.5	2.3
RB19-10K24	1	0.0	0	13.1	1.8	1.2
RB48-10K27	1	7.1	0	6.4	2.0	1.3
<i>E. gallinarum</i>						
RB19-10K25	1	3.8	0	10.7	1.9	1.4
RA20-10K17	1	1.2	0	24.8	3.2	2.0
<i>E. Faecalis</i>						
RB48-10E10	4	10.3	0	6.1	1.3	0.3
<i>Microbacterium</i>						
RA02-10K13	4	0.3	0	13.3	2.2	1.4

より測定した結果を表3に示した。*Enterococcus* 属に属する多くの分離菌株がグルコースから乳酸を蓄積していた。さらに、*E. casseliflavus* と同定されたRB01-10E10株、RA02-10K12株、RA20-10K16株、RA20-10K17株などが

生産するL-乳酸の光学純度は99.4%~99.8%であった。また、リュウキュウアイ浸漬液から分離した多くの微生物は、グルコースから乳酸の他に、酢酸やギ酸も生産することから、好アルカリ性あるいはアルカリ耐性のヘテロ型の乳酸菌であることがわかった。

3-4 浸漬液から調製した泥藍（沈澱藍）の微生物

固形物を分離したリュウキュウアイ浸漬液（浸漬68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酸化させて泥藍を調製した。

リュウキュウアイ浸漬液から回収される沈澱部（泥藍）の体積は、タデアイの場合²⁾ に比べてかなり少ないが、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、4.0ml、4.5ml、5.0mlとわずかに増えた（図6）。しかし、沈澱上部の液部分は、長く静置しても黒く不透明であり、藍染料の回収が不十分であると思われた。後日、リュウキュウアイ浸漬液からの泥藍の回収を再度繰り返しても同様の結果であった。このことから、リュウキュウアイ浸漬液からの泥藍の回収は、タデアイ浸漬液の場合よりも、かなり難しいことを実感した。

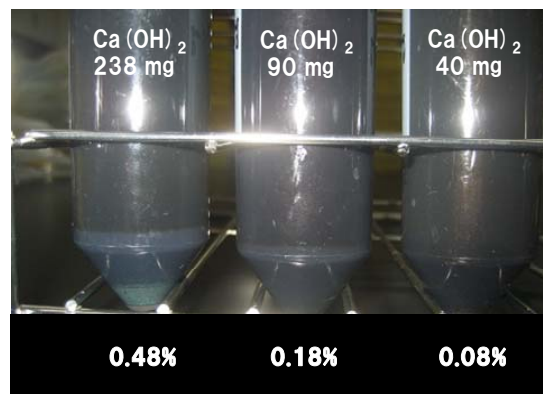


図6 タデアイ浸漬液からの消石灰による泥藍の調製

泥藍の製造時の微生物の特性を表4に示した。消石灰を90mg (0.18%) 添加した場合、溶液はpH11.1を示し、微生物数はpH10およびpH7の寒天平板で、それぞれ 2.5×10^3 、 5.0×10^3 と極端に少なくなった。さらに、消石灰238mg (0.48%) を添加した場合、溶液のpHは12.2となり、pH10およびpH7の寒天平板で検出できる微生物数は、それぞれ 2.0×10^2 、 $<10^2$ となり、ほとんどの微生物は死滅してしまうことが明らかとなった。

表4 消石灰の添加による浸漬液からの泥藍の調製

Ca(OH) ₂ * 添加		pH	沈澱部 容量 (ml)	Colony forming unit (c.f.u.)/ml		
mg	%			pH 10	pH 7	pH 10/pH 7 (ratio)
0	0	6.8	上部	1.8 x 10 ⁷	5.4 x 10 ⁷	1/3
0	0	6.8	下部	2.2 x 10 ⁹	3.7 x 10 ⁹	1/2
40	0.08	8.7	上澄	1.9 x 10 ⁷	1.3 x 10 ⁸	1/7
40	0.08	8.7	4.0	2.5 x 10 ⁸	7.5 x 10 ⁸	1/3
90	0.18	11.1	4.5	2.5 x 10 ³	5.0 x 10 ³	1/2
238	0.48	12.2	5.0	2.0 x 10 ²	<10 ²	

* 溶解度0.155g/100ml at 20℃ ** リュウキュウアイ浸漬液 (68h)

一方、40mgの消石灰を添加した場合、溶液のpHは8.7となり、沈澱部の微生物数は、pH10で2.5×10⁸、pH7で7.5×10⁸であった。また、沈澱の上部液の微生物数はpH10で1.9×10⁷、pH7で1.3×10⁸であったことから、沈澱部に微生物が濃縮されていることが確認できた。さらに、リュウキュウアイ浸漬液の場合、表4に示したように、消石灰を添加しなくても藍染料は酸化にともなって微生物とともに自然沈降してくることも観察された。このことは、高濃度の微生物を含むがアルカリを含まない沈澱藍やその乾燥物が製造できることを示唆している。

3-5 泥藍の還元にもなる微生物の遊離

泥藍の中に含まれている微生物を計数する場合、泥藍を滅菌した0.85%塩化ナトリウム溶液で10¹倍から10⁶倍まで順次希釈するので、泥藍中の過剰な消石灰は10¹倍希釈の段階で溶解すると考えられる。一方、泥藍中のインジゴは希釈しても溶解しないで、分子間水素結合に基づく会合体を形成して高分子のような挙動をする。さらに、インジゴの会合体が互いに凝集して沈澱物となっている。インジゴの会合体や凝集体が形成されて泥藍となる過程で、タデアイ浸漬液に存在した微生物が閉じ込められている可能性があると思われる。

そこで、グルコースの還元力を利用して、アルカリ条件下で泥藍中のインジゴをロイコインジゴに還元して溶解させ、泥藍の微生物の計数を試みた。表4に示した消石灰0.08%添加で沈澱した泥藍をpH10、30℃でL-グルコースで3時間還元した場合と非還元の場合の寒天平板に出現するコロニー数を比較し、結果を表5に示した。

表5から、泥藍をグルコースで還元した場合、還元しなかった場合に比べて、泥藍に含まれる菌数が著しく増大することが確認できた。このことから、泥藍中のインジゴ成分は、藍染めの過程での還元による可溶化と酸化による不溶化にともなって、微生物を遊離したり補足したりしていることが理解できる。

表5 Ca(OH) 240mg 沈澱部（泥藍）からの微生物の回収

(5% L-グルコース還元によるインジゴ可溶化の効果)

泥藍 (40mg沈澱部)	pH	培養	Colony forming unit (c.f.u.)/ml		
			pH 10	pH 7	pH 10/pH 7 (ratio)
L-Glu 非還元	10.0	好気	1.9 x 10 ⁸ (100%)	5.3 x 10 ⁸ (100%)	1/2.8
L-Glu 還元	10.0	好気	4.8 x 10 ⁸ (253%)	7.9 x 10 ⁸ (149%)	1/1.6
L-Glu 非還元	10.0	嫌気	3.2 x 10 ⁸ (100%)	2.8 x 10 ⁸ (100%)	1/0.9
L-Glu 還元	10.0	嫌気	1.0 x 10 ⁹ (313%)	1.1 x 10 ⁹ (393%)	1/1.1

L-Glu還元反応：25℃、pH10、3h

4 おわりに

泥藍の製造に関わる微生物の特性を明らかにするため、リュウキュウアイ浸漬液や泥藍の微生物の特性を調べた。その結果、リュウキュウアイ浸漬液には、*Enterococcus* 属の乳酸菌が優占していることが明らかとなった。*Enterococcus* 属の乳酸菌は、市販の泥藍を製造している現場の浸漬液¹⁾や沖縄産タデアイの浸漬液からも多く分離されている²⁾。さらに、沖縄本島の種々の植物体からも、植物体を培養液に浸漬するにより *Enterococcus* 属の乳酸菌がよく分離される。特に、海岸近くに咲いている花（デイゴ、シマアザミ、シロノセンダングサ、ショウジョウソウ、ハマウド、ハマボックスなど）からは、高頻度に取りれてくる。

また、pH10付近において、沖縄産タデアイやリュウキュウアイの浸漬液から調製した今回の泥藍には、*Enterococcus* 属の乳酸菌が濃縮されて存在する。しかしながら、市販の泥藍からは、*Alkalibacterium* sp.、*Bacillus* sp.、*Microbacterium* sp.などが分離されているが、今までに、*Enterococcus* 属の微生物は分離できていない¹⁾。一方、泥藍を使った藍染め液からは、*Enterococcus* 属の乳酸菌が分離されている³⁾。このことから、浸漬液、泥藍および藍染め液からそれぞれ分離されてくる微生物の相互関係を明らかにするにはさらなる研究が必要ながわかる。

そこでまず、*Enterococcus*属の微生物は、泥藍の製造にどのような役割を果たしているのかを考えてみたい。*Enterococcus*の生産する乳酸や抗菌成分（ナイシン等）などが、浸漬液のpHを6付近に維持しながら腐敗防止に寄与して、インジカンやインドキシルがインジゴへと変換する環境を整え、維持しているのではないと思われる。この役割は、*Enterococcus*属以外の乳酸菌によっても代替できると考えられる。1772年（沖縄本土復帰）～1975年

(沖縄海洋博)の前後7~8年間、リュウキュウアイの浸漬液が腐敗して泥藍が製造できなかった期間がある。この期間、沖縄本島の開発が急速に進み、赤土の海への流出、サンゴ礁の被害など海洋汚染を引き起こしている。環境汚染などの要因によって、*Enterococcus*などの乳酸菌が少なく浸漬液の発酵が不調の場合、浸漬液は茶色になり腐敗して泥藍が製造できなくなるのではないかと。

次に、*Enterococcus*属微生物の泥藍および泥藍が使われる藍染め液における役割について考える。*Enterococcus*属の乳酸菌が、藍染め液の発酵建て(インジゴの還元)に役立っているかどうかは、今のところわからない。すでに、藍染め液から分離されている好アルカリ性乳酸菌 *Alkalibacterium* 属の微生物は、インジゴ還元能をもっていることが報告されている⁴⁾。今後、*Enterococcus* 属だけでなく、藍染め液から分離した微生物のインジゴ還元能を評価する予定である。

泥藍および藍染め液は、強アルカリ性で腐敗しにくいと思われるが、泥藍や藍染め液中の *Enterococcus* 属などの乳酸菌には、代謝産物による抗菌作用や菌体成分による免疫賦活作用が期待される。最近、乳酸菌の免疫賦活作用は、アレルギーや感染症対策と関連しても注目されている。

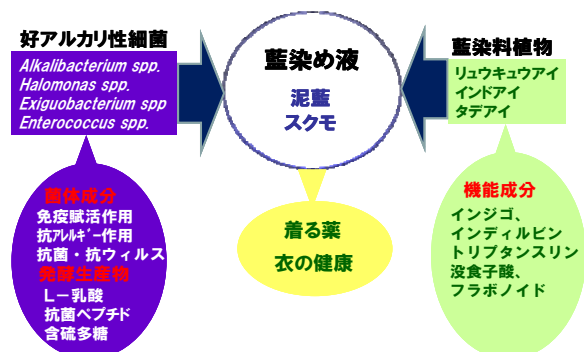


図7 天然の藍染めに期待される効果

今回、泥藍中のインジゴ分子は、酸化および還元によって微生物を補足したり遊離したりしていることを明らかにした。インジゴ分子は、酸化・還元や分子間水素結合などにより、1 nm 以下から数十 μ m 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。

図7に示したように、藍植物や微生物などに由来する種々の機能をもつ成分を、藍染料とともにセルロース繊維などに先着させることもできると思われる。天然の藍染めの効能については、人々は古くから気づいており、いろいろな用途に活用してきたと思われる。今後は、インジゴ分子の特性を応用して、藍植物や微生物の優れた機能性を積極的に繊維や布に付与した藍染め製品が開発

されてくると期待される。また、藍植物や微生物に限定しないで、まったく新規な機能や情報を藍染めプロセスにより付与した製品の出現もありうると思われる。このようなことは、天然の藍だけでなく、化学合成された藍でも可能であろう。

古い藍染め製品について、インジゴ分子に閉じ込められていた微生物、細胞成分、代謝物等を解析することにより、どのような情報が得られるのか、たいへん興味もたれる。当時の藍染め技術やその環境、さらに藍染め製品の履歴などの情報が得られるだろうか。

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、沖縄県工業技術センター平成23年度研究報告書、14、6-10 (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)

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。