

琉球地域の伝統産業「藍染め」に関わる微生物の特性

－宮古島、久米島、沖縄本島の藍染め液について－

常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄

芭蕉布、宮古上布、久米島紬、花織などの琉球地域の伝統染織に広く使用されてきた染色法の一つ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。泥藍を用いた琉球地域の藍染め液は、一般に、*Alkalibacterium* 属、*Enterococcus* 属、*Microbacterium* 属などの好アルカリ性乳酸菌とともに *Halomonas* 属に代表される好アルカリ性の乳酸資化菌が存在する微生物共生系であることが明らかになった。前者は嫌気環境で藍（インジゴ）の還元を行い、後者は好気環境で乳酸を資化して共生系を安定に維持するのに役立っていると考えられる。

1 はじめに

古く琉球王朝の大交易時代に花咲いたといわれる伝統染織の宮古上布や久米島紬、読谷山花織、知花花織は、大部分あるいは一部の糸の染色には藍染料が使われている。その藍染めには、現在、沖縄本島でリュウキュウアイから製造された「泥藍」が用いられている。今回、宮古島の宮古上布、久米島の久米島紬、沖縄本島の読谷山花織および知花花織に使われている藍染め液、さらに奄美大島の藍染め液の微生物等の特性を比較、検討したので報告する。

なお、藍染料として、泥藍を使った沖縄本島の芭蕉布会館の藍染め液とタデアイからの葉（すくも）を使った真壁藍工房（茨城県桜川市）の藍染め液の微生物等の特性については、すでに報告した¹⁾。

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）、塩化ナトリウム（ナカライテスク）、塩化カルシウム二水和物（和光純薬工業）、硫酸第一鉄七水和物（和光純薬工業）、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）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

1978年に国の重要無形文化財に指定されている宮古上布（1975年国伝統工芸品指定）の藍染め液としては、宮古伝統工芸品研究センターにおいて維持管理されていた藍染め液を2010年3月5日に採取し、常温で3日間密閉保存したものを用いた。

2004年に国の重要無形文化財に指定（1975年国伝統工芸品指定）されている久米島紬の藍染め液としては、藍染めを5～6年前まで行っていた企業工場の古い藍染め液を2011年4月23日に採取し、5℃で2日間保存したものを用いた。

1999年に国の重要無形文化財に指定（1976年国伝統工芸品指定）されている読谷山花織の藍染め液としては、読谷村にある読谷山花織事業共同組合の藍染め液を2011年11月30日に採取し、25℃で18時間密閉保存したものを用いた。

2012年に国伝統的工芸品に指定されている知花花織の藍染め液としては、沖縄市にある知花花織事業協同組合

の藍染め液を 2011 年 8 月 31 日に採取し、25 °C で 22 時間密閉保存したものを用いた。

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、塩化ナトリウム 0.1g、塩化カルシウム二水和物 20mg、硫酸第一鉄七水和物 16mg、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 を含む基本培地にグルコース 20g を添加したものを用いた。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。

藍染め液の微生物の特性は、pH 7 および pH10 に調整した 2% グルコースを含む基本培地の寒天平板を用いて調べた。さらに具体的には、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密封し、30°C で数日間培養した後、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 (MACHERY-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 pH 7) に対して 2% 量添加し、30 °C で 3～4 日間静置培養した。

2-8 (R)-3-ヒドロキシ酪酸 (R-3HB) の分解性

R-3HB は、*Cupriavidus necator* 由来のポリヒドロキシ酪酸 (PHB) からブタノリスにより得た R-3HB ブチルエステルをイオン交換樹脂 (DIAION PK228) で加水分解して調製した。0.01% 酵母エキスと無機塩類のみからなる基本培地に炭素源として 0.5% R-3HB を添加した液体培地 (pH 7 と pH10) を用いて、30°C で 4～8 日間振とうあるいは静置培養を行った。培養後、微生物の生育判定とともに残存 R-3HB 量を HPLC 分析により測定した。

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 1 に示した。高原らは、1960 年代に藍染めに微生物が関与することを見いだしている²⁾。インジゴは pH10～pH12 に

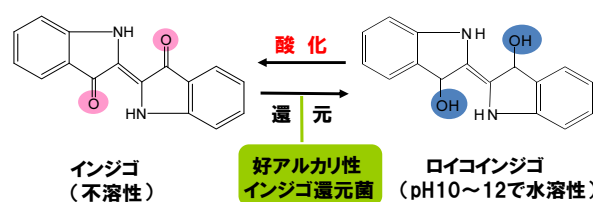


図 1 藍染めによる藍染料 (インジゴ) の化学変化

おいて微生物により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 宮古上布の藍染め液に存在する微生物

400 年以上の歴史を持つ沖縄県宮古島の宮古上布は、図

2の苧麻（ちよま）の繊維を利用した伝統的は麻織物である。その藍染めには、現在、沖縄本島でリュウキュウ



図2 宮古上布の繊維原料の苧麻（ちよま）

ウアイから製造された「泥藍」が用いられている。琉球地域、特に宮古島では、リュウキュウアイが藍染料の原料として使われる以前は、島藍としてタデアイが広く使われていたと考えられる³⁾。また、泥藍を使った藍染め液の色調を調節するため（色に深みをだすため）、宮古島産タデアイを発酵させた「藍玉（餅藍）」を添加する独特の藍染め手法も用いられている。さらに、藍玉は藍建てのための微生物源としての役割も果たしてきたのではないかと考えられる。

宮古上布の藍染め液は図3に示すポリ容器を使って維持管理されており、宮古上布の糸は染色時に藍建てが良好なポリ容器を選んで染めていた。試料採取した藍染め液のpHは、11.7の強アルカリ性であった。



図3 宮古伝統工芸品研究センターの藍染め液

表1には、pH10とpH7の寒天平板上に形成された微生物集落（コロニー）の数により、リュウキュウアイから製造された泥藍を用いた沖縄県内の藍染め液中の微生物数を計数した結果を示した。また、比較のために、タデアイから製造された藍染料の薬（すくも）を用いた真

壁藍工房の微生物等の特性も示した。

一般に、藍染め液はアルカリ環境に維持されており、藍染め液にはpH10の寒天平板上にコロニーを形成できる好アルカリ性微生物が集積されていると理解できる。

宮古上布の藍染め液については、表1に示すように、pH7およびpH10の寒天平板上に好氣的にコロニー形成する微生物の数は、それぞれ 2.4×10^3 と 2.2×10^8 であり、強アルカリ性の条件で生育する好アルカリ性微生物が圧倒的に多く集積されていた。

表1 沖縄県の藍染め液の微生物等の特性

藍染め液			Colony forming unit (c.f.u.) / ml		
試料 No	pH	培養	pH 7/pH10		(ratio)
			pH 7	pH10	
宮古上布	11.7	好気	2.4×10^3	2.2×10^8	1/92000
久米島綿	9.6	好気	5.8×10^3	1.5×10^8	1/260
久米島綿	9.6	嫌気	4.2×10^4	7.3×10^6	1/170
腕谷山花織	11.4	好気	1.9×10^4	3.9×10^7	1/2100
知花花織-1	11.5	好気	1.4×10^3	1.3×10^6	1/930
知花花織-1	11.5	嫌気		1.4×10^5	
知花花織-2	10.5	好気	6.0×10^4	1.0×10^6	1/17
知花花織-2	10.5	嫌気	1.0×10^4	3.3×10^5	1/33
知花花織-3	10.8	好気	2.0×10^4	1.6×10^6	1/80
知花花織-3	10.8	嫌気	3.5×10^3	8.8×10^5	1/250
知花花織-4	10.6	好気	2.9×10^5	1.8×10^6	1/6
知花花織-5	10.7	好気	4.5×10^4	1.4×10^6	1/31
芭蕉布-1	10.7	好気	8.2×10^4	4.9×10^7	1/600
芭蕉布-2	12.0	好気	6.0×10^3	4.6×10^7	1/7700
芭蕉布-5	11.4	好気	2.4×10^6	9.7×10^7	1/40
真壁工房	10.8	好気	1.6×10^5	6.4×10^6	1/40

pH10の寒天平板上では、図4に示したように、大きな淡桃色のコロニーを形成する運動性の好気性細菌が 10^6 程度存在した。



図4 宮古上布の藍染め液の微生物

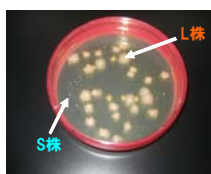
さらに、pH10の寒天平板から種々の微生物を分離し、16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った。その結果、 10^8 程度存在する小さな淡黄色のコロニーを形成するS-1株、S-2株、S-3株、S-4株およびS-5株はいずれも*Alkalibacterium*属の細菌であった。すでに、*Alkalibacterium*属の菌株は、好アルカリ性のヘテロ型乳酸菌であり、藍

の還元活性をもっていることが報告されている⁴⁾。また、大きな淡桃色のコロニーを形成する運動性の好気性細菌 L-1 株は、*Halomonas* 属の細菌であった。

表 2 には、*Alkalibacterium* sp. MY-I-S 株および *Halomonas* sp. MY-I-L 株を pH10 の基本培地 (2% グルコースを含む) で 30℃、15 日間静置培養した場合の有機酸の生成を調べた結果を示した。

表 2 分離株 (L 株+S 株) による糖・有機酸代謝

分離株	培養 日数	グルコース g/l	乳酸 g/l	酢酸 g/l	乳酸 g/l
Control		21.1	0.3	2.6	0
MY-I-L	15	9.2	0.4	4.4	0
MY-I-S	15	0	15.0	3.6	2.6
(L+S)	15	0	1.2	4.8	0



Alkalibacterium sp. MY-I-S 株は、グルコースを完全に消費して培養液中に 15.0 g/l の乳酸を蓄積した。ところが、*Alkalibacterium* sp. MY-I-S 株を *Halomonas* sp. MY-I-L 株と同時に培養すると、グルコースが完全に消費されても、培養液中の乳酸量は 1.2 g/l と低濃度に抑えられていることが明らかになった。

藍染め液を長期にわたって利用するためには、藍の還元活性を有している *Alkalibacterium* sp. MY-I-S 株だけでなく、藍染め液中に蓄積した乳酸を好氣的に消費する好アルカリ性の *Halomonas* sp. MY-I-L のような微生物の存在が必要であることが理解できる。

好アルカリ性乳酸菌である *Alkalibacterium* 属の細菌は通性嫌気性微生物であり、藍染め液の中層から下層の嫌気条件下で藍染料を還元するが、一方、*Halomonas* 属の細菌は好気性微生物であるので、通常、藍染め液が空気と接触する表面に存在している。そのため、藍染め液を良好な状態に維持するためには、毎日、1～2回藍染め液を攪拌して、藍染め液の中に空気を入れてやる必要がある。

3-3 久米島の古い藍染め液に存在する微生物

沖縄県久米島には、久米島紬といわれる絹織物が琉球王府時代から伝承されている。その染色には天然染料が使用され、藍染料も用いられてきた。ここでは、久米島紬の藍染めに使われていた古い藍瓶 (図 5) の藍染め液に



図 5 久米島紬の染色に使われていた古い藍瓶

ついて、その微生物の特徴を調べた。

古い藍染め液は pH9.6 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、これらの微生物は古い藍染め液の中でも盛んに活動しているのではないかと考えられた。

表 1 に示すように、pH 7 および pH10 の寒天平板上にコロニー形成する微生物の数は、好氣的条件下ではそれぞれ 5.8×10^5 と 1.5×10^8 であり、アルカリ性で生育する微生物がかなり多く存在した。一方、嫌気条件下でコロニー形成する微生物の数は、好氣的条件下よりも一桁ほど少なく、pH 7 および pH10 でそれぞれ 4.2×10^4 と 7.3×10^6 であった。藍染め液では、藍染料の種類にかかわらず、好アルカリ性微生物が集積されていることが理解できる。

図 6 には、藍染め液を $10^1 \sim 10^5$ 倍に希釈して、好気および嫌気条件下で 30℃、23 日間培養した寒天平板を示した。好氣的に pH10 で培養した場合に限って、 10^5 倍に希釈した寒天平板にも多くのコロニーが形成されており、藍染め液には好気性の好アルカリ性微生物が集積されていることがわかる。

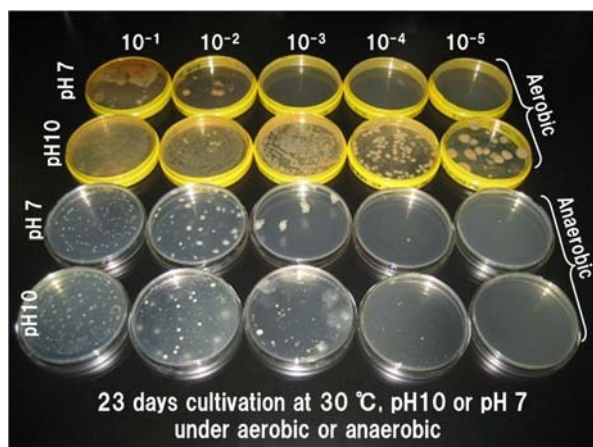


図 6 久米島紬工場の古い藍染め液の微生物

そこで、藍染め液の 10^5 倍希釈液を 0.1ml 塗布して好氣的に培養した寒天平板 (pH10) から、肉眼によりコロニーを特徴別にわけた後、それぞれの代表株を分離し、16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った。その結果、久米島紬の民間工場の藍染め液から寒天平板に出現したコロニーは、32%が *Microbacterium* sp.、12%が *Halomonas* sp.、4%が *Pseudomonas* sp. で、残り 52%が *Alcanivorax* sp. という結果になった (図7)。当然、肉眼で同じと判定したコロニーでも、rRNA 遺伝子解析では異なった微生物と判定されることもあるので、この結果は一応の目安と理解したい。増殖の速い *Halomonas* sp. は寒天平板上に淡桃色の巨大なコロニーを形成した。

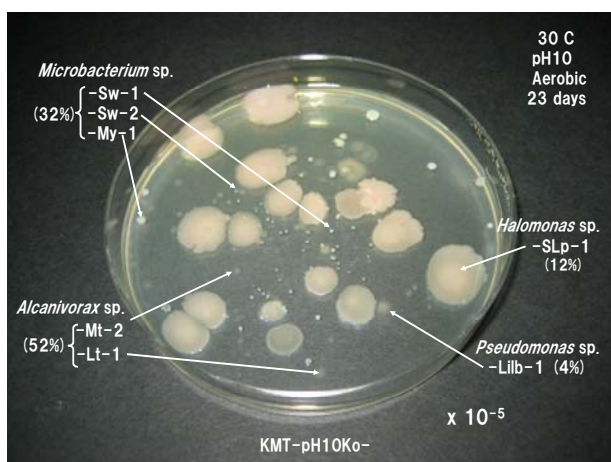


図7 久米島紬の藍染め液の微生物コロニー (pH10)

表3に、久米島紬の古い藍染め液から分離したそれぞれの菌株の有機酸生成能を示した。放線菌 *Microbacterium* 属として同定された KMT-Sw-1 株、KMT-Sw-2 株および KMT-My-1 株はアルカリ性 (pH10) の環境においてグルコースから乳酸を生成した。

表3 久米島紬の藍染め液からの分離株の有機酸生成能

Strains	Genera (by PCR)	Organic acid (g/l)		
		Formic	Acetic	Lactic
KMT-SLp-1	<i>Halomonas</i> sp.	0.5	1.6	0
KMT-Lilb-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.5	1.6	1.1
KMT-Mt-1	<i>Alcanivorax</i> sp.	0.4	1.1	0
KMT-Mt-2	<i>Alcanivorax</i> sp.	0.5	1.2	0.3
KMT-Lt-1	<i>Alcanivorax</i> sp.	0.5	1.2	0
KMT-Sw-1	<i>Microbacterium</i> sp.	0.6	1.7	1.7
KMT-Sw-2	<i>Microbacterium</i> sp.	0.6	1.7	1.4
KMT-My-1	<i>Microbacterium</i> sp.	0.6	1.8	2.4

3-4 読谷山花織の藍染め液に存在する微生物

色糸で細かな花模様などを浮かせる花織は、古くは琉球王朝の御用布として生産されてきた沖縄独特の織物とされ、その一部の糸の染色はリュウキュウアイから製造

された泥藍を使って藍染めされている。

沖縄県中頭郡読谷村の緯浮花織の技法を用いた読谷山花織の藍染め液は、pH11.4 であり、pH 7 および pH10 の寒天平板上に好気条件でコロニー形成する微生物の数は、それぞれ 1.9×10^4 と 3.9×10^7 であり、アルカリ条件で生育する微生物が顕著に多く存在した (表1)。

読谷山花織の藍染め液から分離した YMT-1~YMT-10 の10菌株について、16SrRNA 遺伝子解析による簡易同定を行ったところ、YMT-1~YMT-4の4株は *Alkalibacterium* 属 (図8)、YMT-5株は *Nesterenkonia* 属、YMT-6株と YMT-9株は *Citricoccus* 属、YMT-7株は *Dietzia* 属、YMT-8株は *Microbacterium* 属、および YMT-10は *Enterococcus* 属の細菌と同定された。



図8 読谷山花織の藍染め液の微生物コロニー

読谷山花織および知花織の藍染め液からの分離菌株の乳酸生成能および(R)-3-ヒドロキシ酪酸⁵⁾の分解能を表4に示した。*Alkalibacterium* 属の MYT-1やMYT-2、MYT-3、MYT-4株、TBN-1株は、グルコースを消費して乳酸を生産した。また、*Enterococcus* 属の YMT-10株と TBN-21株はグルコースから大量の乳酸を蓄積した。

表4 分離微生物のグルコースと R-3HB の資化性

Strain	Genera	Anaerobic (pH10)			Anaerobic			Aerobic		
		B.M.	Glu.*	Lact.*	3HB* pH10	3HB* pH10	3HB* pH7	3HB* pH7	3HB* pH7	
YMT-1	<i>Alkalibacterium</i>	+	7.5	5.4	-	5.0	-	-	-	
YMT-2	<i>Alkalibacterium</i>	+	9.8	2.8	-	4.9	-	-	-	
YMT-3	<i>Alkalibacterium</i>	+	7.1	6.0	-	4.7	-	-	-	
YMT-4	<i>Alkalibacterium</i>	+	8.3	4.3	-	5.0	-	-	-	
YMT-5	<i>Nesterenkonia</i>	-	10.3	1.4	-	4.9	-	+	3.2	
YMT-6	<i>Citricoccus</i>	-	10.2	1.4	-	5.0	-	+	4.4	
YMT-7	<i>Dietzia</i> (pink)	-	11.2	1.5	-	4.7	+	3.6	++ 2.5	
YMT-8	<i>Microbacterium</i>	-	10.8	2.1	-	4.9	-	+	++ 1.4	
YMT-9	<i>Citricoccus</i>	-	11.0	1.5	-	4.9	++	2.4	++ 3.3	
YMT-10	<i>Enterococcus</i>	++	0.7	14.7	-	5.0	-	-	-	
TBN-1	<i>Alkalibacterium</i>	+	9.7	2.6	-	4.7	-	-	-	
TBN-2		-	10.7	1.5	-	4.8	-	-	-	
TBN-4	<i>Alkalibacterium</i>	-	10.1	1.4	-	4.7	-	-	-	
TBN-17	<i>Bacillus</i>	-	9.9	1.6	-	4.7	+	-	+	
TBN-21	<i>Enterococcus</i>	++	0.7	14.4	-	4.8	-	-	-	

* g/l

Blue number: 112 h culture +: 8 days culture

一方、*Holomonas* 属の微生物が嫌気的環境で分泌する

ことが知られている(R)-3-ヒドロキシ酪酸⁵⁾は、*Nesterenkonia* 属の YMT-5 株、*Citricoccus* 属の YMT-6 株と YMT-9 株、*Dietzia* 属の YMT-7 株、*Microbacterium* 属の YMT-8 株および *Bacillus* 属の TBN-17 株により分解されているが、これら微生物の藍染め液中における役割は今のところ不明である。

3-5 知花花織の藍染め液に存在する微生物

沖縄県沖縄市の経浮花織の技法を用いた知花花織の藍染め液は pH 10.6~11.5 の強アルカリ性であった。図9に知花花織の藍染め液の瓶を示したが、ポリ容器も含めて、手前から順に1番瓶、2番瓶、3番瓶（ポリ容器）、4番瓶、5番瓶（ポリ容器）の微生物等の特性について調べ



図9 知花花織事業協同組合の藍染め用の瓶

た。表5には、それぞれの藍染め瓶の糖と有機酸の量を示したが、いずれの瓶にも乳酸が蓄積していることがわかる。

表5 藍染め液（知花花織）の糖、有機酸の組成

Indigo dyeing solution	Sugar (g/L), Organic acid (g/L), Ethanol (% v/v)							
	Pot No	pH	Sucrose*	Glucose	Lactic acid	R-3HB	Acetic acid	Formic acid
TBN-1	11.5	0.65	0.75	1.54	0	0.19	0.44	0.15
TBN-2	10.5	1.34	2.11	2.77	0	0.39	1.05	0.18
TBN-3	10.8	1.05	1.80	2.54	0	0.36	0.99	0.18
TBN-4	10.6	1.21	1.97	2.91	0	0.33	0.93	0.17
TBN-5	10.7	1.14	1.88	2.87	0	0.32	0.96	0.18

* Sucrose and Maltose

図10に知花花織の藍染め液（①~⑤番瓶）を $10^1 \sim 10^5$ 倍に希釈して、それぞれ pH 7 と pH10 の寒天平板上に塗布して 30°C で 21 日間好氣的に培養した寒天平板を示した。pH10 の寒天平板では、pH 7 に比べて、①番瓶を除き、小さなコロニーが多く出現する傾向があった。

表1に示したように、pH 7 および pH10 の寒天平板上に好気条件でコロニー形成する知花花織の藍染め液の微生物の数は、それぞれ $1.4 \times 10^3 \sim 2.9 \times 10^5$ と $1.3 \times 10^6 \sim 3.9$

$\times 10^7$ であり、強アルカリ性条件で生育する微生物が多く存在した。一方、嫌気条件でコロニー形成する微生物の数は、好気条件よりも少ないが、pH 7 および pH10 でそれぞれ $3.5 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ と $1.4 \times 10^5 \sim 8.8 \times 10^5$ であり強アルカリ性条件で生育する微生物が多く存在した。

宮古上布や久米島紬の藍染め液、読谷山花織の藍染め液、芭蕉布会館の藍染め液、および真壁藍工場の藍染め

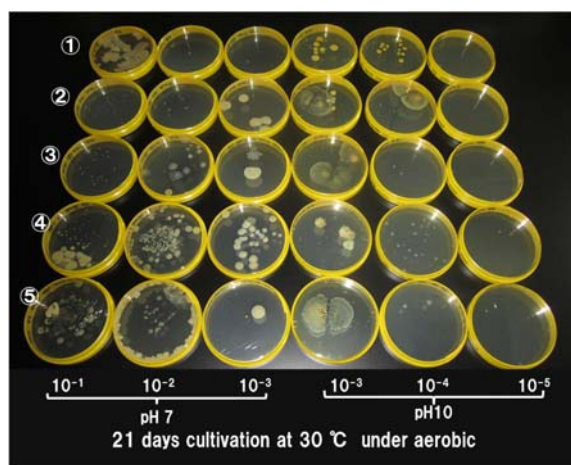


図10 知花花織の藍染液（①~⑤番瓶）の微生物（30°C、好気培養 23 日）

液からの微生物数は、いずれの藍染め液でも、pH10 のアルカリ条件で好氣的に生育できる微生物（通性嫌気性乳酸菌も含まれる）が 10^6 以上のレベルに維持されていることが明らかである。

さらに、知花花織の藍染め液に多く存在すると思われる微生物については、純粋分離を行ってから、16SrRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った結果を表6に示した。

表6 知花花織の藍染め液からの分離菌株

Aerobic		Anaerobic	
Pot-① -Mly-1	<i>Alkalibacterium thalassium</i>	-lb-1	<i>Alkalibacterium thalassium</i>
Pot-② -Mw-1	<i>Alkalibacterium thalassium</i>	-lb-1	<i>Alkalibacterium thalassium</i>
-My-2	<i>Alkalibacterium pelagium</i>	-Sib-2	<i>Alkalibacterium thalassium</i>
-My-3	<i>Alkalibacterium thalassium</i>	-Lw-3	<i>Enterococcus gallinarum</i>
-Sib-4	<i>Halomonas stevensii</i>	-Sib-4	<i>Alkalibacterium thalassium</i>
		-Lb-5	<i>Alkalibacterium</i> sp.
Pot-③ -Mly-1	<i>Alkalibacterium</i> sp.	-sib-1	<i>Alkalibacterium pelagium</i>
-Mly-2	<i>Alkalibacterium thalassium</i>	-Mib-2	<i>Clostridium intestinale</i>
-Slp-3	<i>Alkalibacterium thalassium</i>		
Pot-④ -Mly-1	<i>Alkalibacterium thalassium</i>	Pot-⑤ -Mly-1	<i>Alkalibacterium thalassium</i>
-Lly-2	<i>Alkalibacterium thalassium</i>	-Lly-2	<i>Alkalibacterium thalassium</i>
-Sib-3	<i>Enterococcus gallinarum</i>	-sLip-3	<i>Bacillus rhizosphaerae</i>

それらの多くは、*Alkalibacterium* 属に属する好アルカリ性の乳酸菌であった。また、アルカリ性の環境で生育が速かつ乳酸を消費できる好気性の *Halomonas* 属の細菌も存在した。その他には、乳酸生産能が高い *Enterococcus* 属に属する細菌も分離された。

キュウアイの浸漬液には、*Enterococcus* 属を主として、*Microbacterium* 属、*Lactococcus* 属などの好アルカリ性（アルカリ耐性）乳酸菌が存在することが知られている⁶⁾。

一方、タデアイ由来の藍染料である菘（すくも）を用いた藍染め液の微生物についても、それらのルーツに興味もたれる。すでに、我々は徳島産の菘から *Oceanobacillus* 属、*Alishewanella* 属、*Ornithinibacillus* 属など、徳島産の菘を用いた藍染め液（茨城県桜川市の真壁藍工房）から *Alkalibacterium* 属、*Amphibacillus* 属、*Bacillus* 属などと rRNA 遺伝子解析により簡易同定される微生物を分離したことを報告した⁷⁾。

また、Anio らは、北海道産の菘を用いた藍染め液（北海道伊達市）には *Alkalibacterium* 属、*Amphibacillus* 属、*Clostridium* 属、*Alcaligenes* 属などの微生物が存在することを報告している⁸⁾。なお、Aino らは、*Alkalibacterium* 属に加えて、*Amphibacillus* 属や *Oceanobacillus* 属の微生物もインジゴの還元能をもっていることを報告している⁸⁾。

我々は、藍染め液の微生物のルーツとして、海や山など周囲の環境にいる微生物が、風や飛来塩により運ばれてくることもあり得ると考えている。特に、琉球地域では、海の微生物の影響が大きいと考えられる。

そこで、図14に示す滅菌ガーゼを挟んだ道具を用いて、風や飛来塩からの微生物の分離を試みた。ガーゼ（10 cm x 10 cm）は、沖縄県工業技術センター（沖縄県うるま市州崎）の外付け階段2階踊り場に東西方向と南北方向に設置した。強風の日ではあったが21時間後に回収して、ガーゼに捕捉された微生物数を計数し、その結果を表7に示した。



図14 風の微生物を捕捉するためのガーゼ

東西方向に面したガーゼには、pH 7 および pH10 で生育する微生物が、好気条件ではそれぞれ $2.4 \times 10^5/100 \text{ cm}^2$ 、 $2.0 \times 10^4/100 \text{ cm}^2$ 、嫌気条件では $1.2 \times 10^5/100 \text{ cm}^2$ 、 $1.2 \times 10^5/100 \text{ cm}^2$ であった。また、南北方向に面したガーゼには、pH 7 および pH10 で生育する微生物が、好気条件ではそれぞれ $1.2 \times 10^4/100 \text{ cm}^2$ 、 $4.2 \times 10^3/100 \text{ cm}^2$ であった。

ガーゼの向きにより10倍以上の微生物数の違いや放線菌様微生物の割合が大きく異なることが明らかとなった。また、風が運ぶ好アルカリ性（アルカリ耐性）微生物が嫌気条件で多く分離できることも興味深い。

風から分離した微生物は、16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った結果、*Oceanobacillus* 属、*Exiguobacterium* 属、*Bacillus* 属および *Cellulomonas* 属の

表7 風や飛来塩が運ぶ微生物の特性

2011.8.3.15:00~2011.8.4.12:00, 21 h
(平均風速15.6m/s、北北東、降水量2.5mm、気温27.8℃、日照1.8h)*

ガーゼ面の向き	培養	Colony forming unit (c.f.u.) / 100 cm ²		
		pH 10	pH 7	pH 10/pH 7 (ratio)
東面	好気	2.0 x 10 ⁴ (2%)	2.4 x 10 ⁵ (13%)	0.08/ 1
東面	嫌気	1.2 x 10 ⁵ (0%)	1.2 x 10 ⁵ (13%)	1/ 1
南北	好気	4.2 x 10 ³ (79%)	1.2 x 10 ⁴ (100%)	0.35/ 1

*うるま市宮城島 青字: 放線菌様コロニー
東西 *Exiguobacterium mexicanum* *Cellulomonas hominis* 南北 *Oceanobacillus profundus* *Bacillus gibsonii*

微生物であった。*Oceanobacillus* 属や *Exiguobacterium* 属、*Bacillus* 属の微生物は、好アルカリ性乳酸菌として海からも分離されている。また、*Oceanobacillus* 属は藍染め液からも見つかっている藍（インジゴ）還元活性を持つ微生物としても知られている。

このことから、風が好アルカリ性乳酸菌など海洋由来の微生物を人々の活動圏にも運んでいることが明らかである。

図15は、宮古島島尻マングローブの泥層の集積培養液（pH10）を10,000倍に希釈して、0.1 mlをpH10の寒天平板に塗布し、30℃、6日間好氣的に培養したシャーレである。

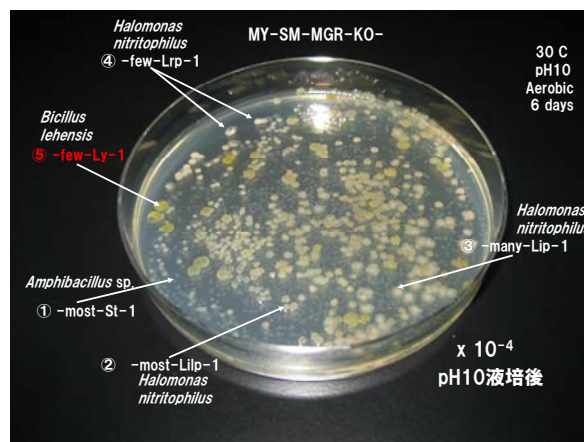


図15 宮古島島尻マングローブ泥層の微生物

この平板から多数を占めるとされる微生物を分離して、16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った結果、*Amphibacillus* 属、*Halomonas* 属および *Bacillus* 属の微生物

であり、藍染め液に類似していることがわかった。

マングローブ域は、栄養源が比較的豊富で、潮の干満によって好気的環境と嫌気的環境が周期的に繰り返され、pH8.3とアルカリ性であることなど、藍染め液との共通点が多い。人々の活動圏にたいへん近いマングローブ域の微生物が藍染め液とよく似ているということは、藍染め液の微生物のルーツを考え、藍建てを良好に行うのにも役立つのではないかとと思われる⁴⁾。

4 おわりに

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と思われる。

しかしながら、強いアルカリ性の泥藍を使用する琉球地域の藍染め液は、藍染めに必要な微生物を維持管理するのが極めて困難な現状であり、天然の藍染め過程の科学的解明が求められている。泥藍を使用する藍染め液の微生物学的な解明は、天然の藍染めが広く行われている沖縄の伝統染織にとっても非常に重要である。

琉球地域の藍染め液は、一般に、*Alkalibacterium* 属、*Enterococcus* 属、*Microbacterium* 属などの好アルカリ性(アルカリ耐性)乳酸菌と好アルカリ性乳酸資化菌である *Halomonas* 属が存在する微生物共生系であることが明らかになってきた。前者は嫌気環境で藍(インジゴ)の還元を行い、後者は好気環境で乳酸を資化して共生系を安定に維持するのに役立っていると考えられる。藍染め液の活性を安定に維持するためには、嫌気環境と好気環境を周期的に繰り返すことが必要である。このことは、清酒や焼酎、ビール、ワインなどのアルコール発酵と異なる特徴である。

微生物共生工学的に藍染め液の高活性化を図るためには、栄養源等の供給と通気のバランスを工夫して、乳酸菌が作り出す還元力を高めて持続させると同時に、還元力を効率的に酸化型の藍(インジゴ)に供与して、還元型の藍(ロイコインジゴ)に変換することが必要と思われる。

一方、高いアルカリ性を示す藍染め液は、好アルカリ性微生物の分離源として有望である。好アルカリ性微生物を利用したバイオマスからの有用物質の生産は、雑菌汚染のリスクが低いので、装置や培地の高圧滅菌をする必要がない省エネルギープロセスが期待される。

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。

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、沖縄県工業技術センター平成22年度研究報告書、**13**、7-11(2011)
- 2) 高原義昌、田辺脩：還元細菌に関する研究(第13報) *Bacillus alkaliphilus* の生育因子について、工業技術院発酵研究所報告 **22**、85-90(1962)
- 3) 深石隆司「嶋藍・唐藍考」、沖縄タイムス(2000.1.11-14)
- 4) I. Yumoto, K. Hirota, Y. Nodasaka, Y. Tokiwa and K. Nakajima: *Alkalibacterium polygonumreducens* sp. Nov., an obligate alkaliphilic that reduces an indigo dye. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 901-905(2008)
- 5) 常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄：マングローブ域からの(R)-3-ヒドロキシ酪酸資化菌の分離とその特性、沖縄県工業技術センター平成24年度研究報告書、**15**、1-6(2013)
- 6) 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)
- 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、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)
- 8) 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)

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。