

琉球地域の伝統産業「藍染料製造」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の製造に関わる微生物の特性について検討した。藍染料は、リュウキュウアイの浸漬液を発酵させてインジカン抽出する前工程とインジカンに消石灰を加えて藍染料（インジゴ）に変換して泥藍を沈澱させる後工程により製造される。前工程の発酵液には、pH7で生育する微生物が主であった。pH10で生育できる微生物はpH7の1～16%であり、分離株の中では *Enterococcus* 属に属する菌株が多かった。後工程の高アルカリ環境となる泥藍では、pH7とpH10で生育できる微生物数がそれぞれ 10^9 (c.f.u./ml) と多く存在した。しかし、pH10で分離できた菌株は、*Enterococcus* 属ではなく、*Alkalibacterium* 属等に替わっていた。泥藍の高アルカリ環境での貯蔵や脱水工程がその微生物相に影響を与えていると推察された。

1 はじめに

リュウキュウアイ（キツネノマゴ科）は、インドからインドシナ半島、中国南部、台湾、沖縄県、鹿児島まで広く分布する藍植物の一つである（図1）。



図1 タイ国チェンマイ市内のリュウキュウアイ

リュウキュウアイからの藍染料である泥藍（琉球藍）は、琉球王府時代からの歴史を持ち、芭蕉布、紅型、宮古上布、琉球絣、久米島紬などの伝統染織に古くから用いられている。明治中期（1890年頃）には、泥藍の経済的評価が高くなり、静岡県、山梨県、群馬県などにまで泥藍の製造技術が普及したことが知られている。

一方、四国のタデアイからの藍染料であるスクモ（阿波藍）は、すでに江戸時代には盛んに生産されており、20世紀初めが最盛期であった。さらに、1897年にはインドアイ（マメ科）からの藍染料である沈澱藍（藍錠）の輸入も行われている。しかし、1897年にドイツで工業生産が始まった安価な化学合成藍のインジゴ染料が、20世紀初めから大量に輸入されるようになり、リュウキュウアイやタデアイなどの天然の藍染料の需要は急減した。

その後も泥藍は、沖縄県内の伝統染織に広く使用されてきたので、泥藍の製造は細々ではあるが継続されてきた。1977年には、泥藍の製造技術は国の選定保存技術に

指定されている。

現在、泥藍は沖縄県本部町伊豆味の近辺でのみ製造されているが、2010年度の生産量は、6月と11月の年2回を合わせても、7トン程度にまで落ち込んでおり、伝統産業といえども厳しい状態にあると思われる。

泥藍は、リュウキュウアイ（葉と枝）の浸漬液を発酵させた後、消石灰を加えて激しく攪拌して藍染料を酸化・沈澱させることによって製造される。この泥藍の製造方法や藍染料の形態や濃度は、タデアイ（タデ科）の乾燥葉を3ヶ月ほど発酵して製造される四国や北海道の藍染料「スクモ」とは大きく異なっている。

天然の藍染料を用いた藍染め液には、微生物が存在して藍染めに重要な役割を果たしていることは古くから知られている。しかし、リュウキュウアイからの藍染料である泥藍の製造に関与している微生物の研究は見当たらない。

今回、琉球地域の伝統産業である藍染料製造に関わる微生物および製造された泥藍の微生物の特性について検討した。また、リュウキュウアイを原料とする泥藍とタデアイを原料とするスクモとの違いについても微生物学的な面から考察を行ったので報告する。

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 リュウキュウアイ浸漬液と泥藍

リュウキュウアイの浸漬液と泥藍は2009年6月10日に採取し、5℃で3日間密閉保存したものをを用いた。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寒天平板培地を用い、30℃で培養して調べた。リュウキュウアイの浸漬液と泥藍の採取は、その後も必要に応じて行い、研究に供した。

タデアイからの藍染料であるスクモは、2008年に徳島県の藍師により製造されたものをを用いた。

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。

微生物の特性は、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、pH7とpH10に調整した寒天平板培地に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。

3 実験結果および考察

3-1 泥藍の製造プロセス

リュウキュウアイから泥藍を製造する一般的なプロセスについて、伊野波藍製造所(沖縄県本部町伊豆味)を例として図2に示した。

①では、リュウキュウアイ(葉と茎)約3トンを水に浸漬して、木杵で押さえて発酵を行う。②では、リュウキュウアイから藍染料の前駆体インジカンが発酵にともなって溶出され、浸漬液が青緑色になる。③では、酸化槽(沈殿槽)に移された浸漬液に消石灰を加えてインジカンを藍染料(主としてインジゴ)に酸化して沈殿させる。④は酸化槽の沈殿を貯蔵槽に保管し、注文に応じて、麻布により水切りをして水分調整した泥藍である。



図2 伊野波藍製造所における泥藍の製造プロセス

泥藍の製造は、通常6月と11月の2回行われる。リュウキュウアイの浸漬時間は気温により異なり、6月の場合には40～60時間、11月の場合には90～120時間ぐらいである。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。沖縄本島の開発が急速に進んだ1972年前後の7～8年間は、浸漬液が腐敗して泥藍ができなかった期間がある。

リュウキュウアイの葉や枝のインジカン^(β-グルコシダーゼ)は、浸漬槽と酸化槽において、図3に示すような化学変化を受ける。

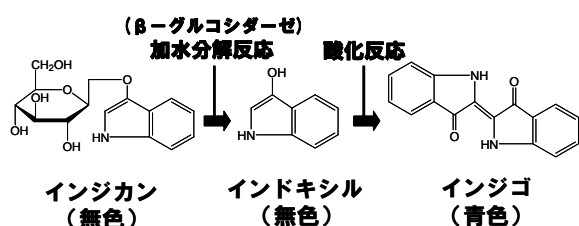


図3 リュウキュウアイから藍染料までの化学変化

3-2 リュウキュウアイ浸漬液の微生物

浸漬液の微生物は、主としてリュウキュウアイ、浸漬に使用する水、浸漬期間中の大気等に由来するものと考えられる。浸漬期間中に、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の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。また、2分子のインドキシルが反応しロイコインジゴ（弱酸性や中性では水に不溶）が生成している可能性もあると考えられる。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、浸漬液の微生物に由来する同様な酵素が働いている可能性もあると思われる。一方、浸漬液中の微生物には、乳酸発酵などによる腐敗防止の機能も考えられるが、発酵液中の微生物の役割は未だ不明な点が多い。

リュウキュウアイやインドアイからの藍染料である泥藍の製造には、同じような浸漬工程が行われているが、タデアイからも同じような方法により泥藍を製造することは可能である。タデアイからの藍染料スクモの製造には約100日を要しているが、浸漬法を利用することにより、タデアイからの藍染料製造の期間を大幅に短縮できる利点がある。

表1には、2009年6月に2カ所（AとB）の泥藍製造所について、リュウキュウアイ浸漬液の微生物の特徴を調べた結果を示した。また、Bで製造された泥藍の微生物についても示した。

表1 浸漬液および泥藍の微生物の特性

試料	Water pH	Water cont.(%)	Colony forming unit (c.f.u.)/g (dry wt)		
			pH 10	pH 7	pH 10/pH 7 (ratio)
A浸漬液 (2 days)	5.7		8.40 x 10 ⁵ /ml	6.40 x 10 ⁶ /ml	0.01/1
B浸漬液 (1 day)	6.8		3.95 x 10 ⁵ /ml		
B浸漬液 (4 days)	6.1		1.25 x 10 ⁴ /ml		
B泥藍	12.6	61.6	1.25 x 10 ⁹	3.19 x 10 ⁹	0.4/1

浸漬液や泥藍には 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。リュウキュウアイの浸漬日数が4日目になると、pH10の寒天平板に好氣的に生育できる微生物数は減少した。泥藍には非常に高い微生物数が確認できた。pH10よりもpH7で生育する微生物の割合の方が多く、浸漬液の微生物数を反映していると考えられた。

表2 リュウキュウアイ浸漬液の微生物の特性

浸漬液 日数	pH	培養	Colony forming unit (c.f.u.)/ml		
			pH 10	pH 7	pH 10/pH 7 (ratio)
A (2日)	6.0	好気	9.1 x 10 ⁵	4.3 x 10 ⁷	0.02/1
B (3日)	6.2	好気	8.0 x 10 ⁵	2.6 x 10 ⁷	0.03/1
B (3日)	6.2	嫌気	2.3 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷	0.16/1
C (3日)	5.8	好気	1.7 x 10 ⁵	1.2 x 10 ⁷	0.01/1

表2には、別の年度（6月）に調べたリュウキュウアイ浸漬液の微生物の特徴を示した。pH7の寒天平板上にコロニーを形成する微生物の数（c.f.u./ml）は、3カ所の泥藍製造所の浸漬液において10⁷レベルであった。pH10の寒天平板に生育できる好アルカリ性あるいは耐アルカリ性の微生物は、pH7に生育する微生物数の1～3%であったが、嫌気条件ではその割合は16%と高くなった。

このことから、嫌気的環境が、酵母や乳酸菌などの通性嫌気性微生物において、酸化ストレスなどを低減してアルカリ環境における適応性を高めるという可能性も考えられた。R. Serranoらは、酵母の増殖について、アル

カリ環境のストレス回避と活性酸素の処理酵素との関連を議論している¹⁾。

3-3 浸漬液から分離した微生物の特性

表2の浸漬液Aを1000倍希釈して寒天平板(pH10)に0.1mlを播き、30℃で17日間、好気培養した場合のコロニーを図3に示した。図中の1~5の番号(赤字)の微生物は、16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定の結果、*Enterococcus* sp.であった。*Enterococcus* sp.は、植物体から多く分離されており、「植物性乳酸菌」とも呼ばれ、特に最近、その免疫賦活作用がアレルギーや感染症対策とも関連して注目されている²⁾。その他、浸漬液Aには、*Cellulosimicrobium* sp., *Brachy bacterium* sp., *Kocuria* sp.などに同定されるものが存在することが明らかとなった。

また、浸漬液Bからも多くの *Enterococcus* sp.や数株の

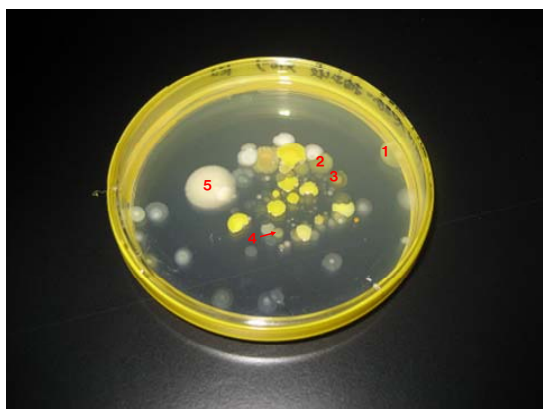


図4 浸漬液Bの寒天平板(pH10)のコロニー(好気)

Cellulosimicrobium sp.が分離されているほか、*Leucobacter* sp. や *Arthrobacter* sp.も浸漬液Bから分離されている。

藍染料の製造において、リュウキュウアイの浸漬液から分離されたそれぞれの菌株の役割は、未だ不明である。さらに、浸漬液の微生物の由来を解明することも興味ある課題である。浸漬液の発酵初期には、リュウキュウアイに付着している微生物の影響が大きいと思われる。*Enterococcus* sp.は沖縄本島の種々の植物体からも分離されている。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)からは高頻度に分離されてくる。これらの微生物は飛来塩などに付着して海からやってくることも考えられる³⁾。

表3には、リュウキュウアイの浸漬液からの分離株による有機酸の生産能を初期pH10で調べた結果を示した。

pH10で分離した多くの *Enterococcus* 属の菌株は、アルカリ条件で乳酸を生産していた。乳酸の他に、ギ酸や酢酸なども生産することから、*Enterococcus* sp.の分離株はヘテロ型の乳酸生産菌であることがわかる。特に、生産

された乳酸の光学純度が99.4%のL-乳酸であることは注目される。光学純度の高いL-乳酸は、生分解性プラスチックであるポリL-乳酸の原料に欠かせないものである。

表3 浸漬液からの分離菌株の有機酸生成能

菌株	浸漬液	属名 (PCR同定)	有機酸 (g/L)		
			ギ酸	酢酸	乳酸(L型%)
AY34cwb	A	<i>Enterococcus</i> sp.	4.1	0.6	12.8 (99.4)
AY34cws	A	<i>Enterococcus</i> sp.	4.3	0.6	12.3
AY34fwb	A	<i>Enterococcus</i> sp.	4.2	0.2	11.3
AY34fws	A	<i>Enterococcus</i> sp.		+	
AY34yw	A	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	1.6	2.0	
AI49cb	B	<i>Enterococcus</i> sp.			15.4 (99.4)
AI49cs	B	<i>Enterococcus</i> sp.	2.7	1.8	0.2
AI49w	B	<i>Enterococcus</i> sp.	3.4	0.1	14.9
AI49y	B	<i>Leucobacter</i> sp.		0.5	

3-4 泥藍の微生物とその特性

発酵が終了したリュウキュウアイの浸漬液は、酸化層に移され、消石灰(水酸化カルシウム)が加えられて高アルカリ性の液体になる。

消石灰を添加する時期とその量は、泥藍の収率と品質を左右するのでたいへん重要である。添加する時期は、浸漬液中のリュウキュウアイの葉柄の皮の剥がれ具合と浸漬液の色により判断される。葉柄の皮が溶けるように剥がれ、浸漬液が青緑色になった時が好機とされている。また、消石灰の量は、消石灰が加えられた浸漬液を底から表面に攪拌した瞬間に「ウサギの目の色」といわれる赤みが見えたときが消石灰の添加の止め時とされている。しかし、その赤みを判断するのはかなりの経験を要する。赤みの原因は、従来、インジゴが生成する時の副産物であるインジルビン(赤色)によると考えられているが、ロイコインジゴ(インジゴが還元されたもの)のラジカル(赤色)や強アルカリ性による浸漬液の変化(茶褐色)などの可能性もあると思われる。

表4 泥藍(沖縄産)とスクモ(徳島産)の微生物の特徴

	Colony forming unit (c.f.u.)/g (dry wt)				
	Water pH	Water cont.(%)	pH 10	pH 7	pH 10/pH 7 (ratio)
スクモ	10.3	20.1	4.72 x 10 ⁸	1.13 x 10 ⁶	418/1
泥藍	12.6	61.6	1.25 x 10 ⁹	3.19 x 10 ⁹	0.4/1

沖縄産「泥藍」と徳島産「スクモ」の微生物の特性を比較したものを表4に示した。表1でも示したように、泥藍はBの藍製造所で造られたものである。泥藍のpH12.6およびスクモのpH10.3と両者とも強アルカリ性である。スクモの水分は20.1%で乾燥しており、黒い小石のような硬いかたまりであるが、泥藍は水分含量が

61.6%と高くペースト状である。スクモには、好アルカリ性の微生物が、pH7で生育する微生物の約400倍と圧倒的に多く存在していた。

一方、泥藍では、pH7で生育する微生物の方が多く存在し、菌数もスクモよりも多く存在していた。

このことから、スクモの製造は、約100日間をかけて乾燥貯蔵したタデアイの葉を堆肥状にしながらか藍染料の濃度を高めると同時に好アルカリ性微生物を集積する技術であると考えられた。

それに対して、泥藍の製造は、収穫したての新鮮なリュウキュウアイの葉と枝を3~5日間、水に浸漬して発酵させながら藍染料の前駆体インジカン抽出する前段階と、消石灰を発酵液に加えて高アルカリ環境で酸化生成させた藍染料と微生物を非選択的に消石灰とともに速やかに沈殿させて泥藍の中に閉じ込める後段階、の二つの過程からなる技術であると推察された。

スクモや泥藍に存在する微生物は、藍染めの藍建てに役立つことが期待される。

泥藍から分離できた微生物株は、*Alkalibacterium* sp., *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp. などであった。*Alkalibacterium* sp. は、すでに、スクモ由来の藍染め液から分離され、藍の還元能をもっていることが報告されている⁴⁾。リュウキュウアイの浸漬液に多く存在した *Enterococcus* sp. は、泥藍から分離できなかった。この原因の一つは、酸化槽で消石灰とともに沈殿してできた泥藍を製品として出荷するまでの過程にあるのではないかと考えられる。酸化槽でできた泥藍は、上澄み液と分けられ、ポンプで貯蔵槽に移され保管される。保管されている泥藍は、注文に応じて、麻布を使った手作りの簡易ろ過機により時間をかけて水切りを行い、やや固めの泥藍になってから袋詰めして出荷される。この間、泥藍はpH12程度の強アルカリ環境に置かれ、アルカリ性に弱い微生物の死滅と、アルカリ性に強い微生物の集積や外部環境からの移入が起っていると思われる。

泥藍の製造が行われている期間中において、泥藍の貯蔵槽の表面水には、pH10で生育できる微生物の数(c.f.u./ml)は、 $2.2 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^6$ であった。この微生物の数はリュウキュウアイ浸漬液に近かったが、分離されてきた微生物は胞子をもつ *Bacillus* sp. のみであった。

1年程貯蔵された藍染料のスクモから分離できた微生物株は、*Bacterium* sp., *Ornithinibacillus* sp., *Oceanobacillus* sp. などであった。

表5には、2009年6月以降に製造された泥藍の微生物の特性を示した。pH10およびpH7で生育できる微生物の数が少なく、微生物が全く検出されないケースもあっ

た。表5からは、泥藍に存在する微生物の種類や数は、製造時期や場所によって異なっており、安定していないことがわかる。

表5 泥藍の微生物の特性

泥藍		Colony forming unit (c.f.u.) /g		
(生産月)	pH	培養	pH 10	pH 7
B (11月産)	12.2	好気	0	$5.43 \times 10^3/g$
B (11月産)	12.2	嫌気	0	0
C (6月産)		好気	$1.3 \times 10^5/ml$	$5.0 \times 10^2/ml$
D		好気	$4.4 \times 10^5/g$	$8.9 \times 10^5/g$
D		嫌気	$1.3 \times 10^5/g$	0

今後、泥藍に含まれる微生物の特性については、泥藍を使った藍染め現場への影響も考慮しながら、泥藍の製造過程との関連を解明していくことがたいへん重要と思われる。

4 おわりに

今回、琉球地域の代表的な藍染料である泥藍および泥藍が使用される藍染め液が高いアルカリ性であるので、好アルカリ性あるいは耐アルカリ性の微生物に注目して、リュウキュウアイの浸漬液と泥藍の微生物の特性について検討を行った。

しかし、リュウキュウアイの浸漬液の発酵はpH6付近で行われていることから、pH7の培地で生育する微生物が大多数であり、これらの微生物にも注目する必要があると思われる。現段階では、浸漬液中の微生物が泥藍の製造にどのように関与しているのかは不明である。

また、泥藍の微生物はリュウキュウアイ浸漬液の微生物の特性と異なっていることも明らかになった。さらに、泥藍の微生物の特性も安定していないことがわかった。今後、泥藍の微生物が藍染め液の微生物とどのような関係があるのかも念頭に置いて、検討していくことが重要と思われる。

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) R. Serrano, D. Bernal, E. Simon, J. Arino: Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J. Biol. Chem.*, **279** (19), 19698-19704 (2004)
- 2) 嶋田貴志、白川太郎: 新規乳酸菌 *Enterococcus casseliflavus* Shirakawa 株の死菌体(NP-04)のアレルギー

予防効果について、第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会(要旨)、**54**(3・4)、329 (2005)

3) 中村英二郎、安里昌樹、羽地龍志、環境に適した製品創製のための腐食環境予測・評価システムの開発(その 1)-腐食環境因子測定について-、沖縄県工業技術センター平成 18 年度研究報告書、**61-70** (2017)

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。