

令和元年6月12日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07684

研究課題名(和文) 藍染発酵液の染色強度と微生物叢相関の解明

研究課題名(英文) Clarification of changes of microbiota, which sustain intensities of indigo-reduction in indigo fermentation

研究代表者

湯本 勲 (Yumoto, Isao)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究部門付

研究者番号：30358303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：藍の発酵液にとって重要なことは藍の還元が速やかに起こることと、その還元状態が長期間維持出来ることである。発酵状況を把握し適切な判断のもとに対応することは長期間に渡って良好な状態に維持するために重要である。本研究の目的は発酵初期に還元が起こる際の微生物叢の変化を把握することと、発酵のメンテナンスに対して基質添加のおよぼす影響を理解し、発酵状態の良否を微生物叢で判断することを検討し、藍の発酵について良い状態を長期化することである。検討の結果、発酵初期の前処理が藍還元の要因を左右することと発酵期間中の基質添加が微生物叢に与える影響および染色状態と微生物叢の関係の特徴を捉えることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発酵の初期の高温、高アルカリ性の処理が、発酵に必要な微生物を選抜し、存在が好ましくない微生物を排除していることを明確に示すデータが得られた。これは多くの発酵の前処理の意味をハッキリしたデータとして示した非常に貴重なデータと考えられる。また、短期間で還元能力が低下した系と長期間還元状態を維持した系を比較することによって発酵液の微生物叢のあるべき姿を通じて、藍発酵液を長期間維持するためにどのようなメンテナンスを施すべきかを明らかにした。このことは、他の自然発酵系の維持にも応用出来るものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Occurrence of indigo-reduction within 10 days after the preparation and the maintenance of the reduced state longer are important in indigo fermentation. Carrying out appropriate treatments according to the grasping the fermentation situation are also important for its lasting for long period. A purpose of this study is understanding followings: changes of microbiota in the initiation of reduction of indigo, the influence of substrate addition for the microbiota and relationship between staining intensity and the microbiota. It is considered that the obtained results will realize long-lasting indigo-fermentation. The examined results indicated that appropriate pretreatment procedure is important to adjust the desirable microbiota. In addition, the influence that substrate addition on the microbiota and dyeing intensity related microbiota were clarified.

研究分野：微生物生理生態学

キーワード：インジゴ還元 発酵の前処理 藍染め 微生物叢 Alkalibacterium Amphibacillus

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

従来の日本の藍染色のプロセスは、2つの微生物活動ステップから成る。まず一つ目は、タデ藍の植物体を堆肥状にし、植物体中の色素が濃縮しスクモと呼ばれるものを作成する。スクモは後段の発酵において、色素だけでなく種菌、微生物のエサ、微生物が付着する担体をも提供しているものと考えられる。2回目のステップでは、スクモは高温の木灰熱抽出物(灰汁)(pH 10.5-11、60-80)で扱われる。この処理によりスクモに含まれる微生物は、藍の発酵液(嫌気性アルカリの環境)中で適応することができる微生物の最初の試練である。温度(60-80)とpH(10.5-11)の組合せ、そしてその厳しい環境への露出時間は、藍の発酵液のインジゴの還元において中心的な役割を演ずるインジゴ還元微生物の適切な選択にとって重要である可能性がある。

上記の過程で調整した藍の発酵液にはインジゴ還元微生物が存在し、インジゴを還元する。日本の伝統的な方法で作られた発酵液からの11種のインジゴ還元微生物が特定されてきた。特定されているインジゴ還元微生物は、2つのタイプに大まかに分類することが出来る: 酸素がある場合は酸素を利用しない時は嫌気代謝を行う通性嫌気性菌および代表的なインジゴ還元菌 *Alkalibacterium* 属と *Amphibacillus* 属細菌の様な酸素があってもなくても生育するが、酸素があっても利用しない酸素耐性の嫌気性微生物である。さらに、未同定の偏性嫌気性菌もインジゴの還元に寄与している可能性が考えられる。多様なインジゴ還元微生物が、藍の発酵液中に存在することが知られているが、機能の違いや検出される時期と発酵期間との関係については不明である。

## 2. 研究の目的

日本では、藍の染色は、伝統的な自然発酵によって行われてきた。藍の発酵液は1週間から10日前後で藍の還元が始まり、平均して6ヵ月の間還元した状態を維持する。しかし、発酵液は、開放系で運用されており、特に染めているプロセスの間に、外部からの微生物のコンタミが起こる可能性が高い。一般的に発酵状態の良否は、仕込みの工程にかかっていると考えられる。さらに発酵状況を把握し適切な判断のもとに対応することは長期間に渡って良好な状態に維持するために重要である。藍の発酵液は還元が起こるタイミングにばらつきがあるが、外部からのコンタミは頻繁に起こる条件下においても少なくとも半年以上は還元状態を維持する。本研究において藍の発酵について良い状態を長期化するために、発酵の仕込みとメンテナンスの重要性に着目し、発酵初期に還元が起こる際の微生物叢の変化を解析することと、発酵のメンテナンスに対して基質添加のおよぼす影響を検討するとともに、発酵状態の良否を微生物叢で判断することを検討した。

## 3. 研究の方法

### 藍発酵液の準備とそのメンテナンス

藍発酵液のバットは、木の灰沈殿物を含んでいるスクモと木灰の熱水抽出液(灰汁)を用い、混合することによって準備された。混合物のpHは、11.2に調節した。灰汁は、木灰と水を混ぜ合わせて、10分間沸騰することによって調整した。発酵液のバットは1日26にインキュベートした後10分間加熱した後、再度26でインキュベートを継続した。発酵液のバットは1日に一度攪拌棒で攪拌した。発酵液のpHはCa(OH)<sub>2</sub>を加えることによって10.3~11.3の範囲に調節した。染色強度は時折、綿の織物の小片を発酵液に浸すことによって確認した。

### DNA抽出とPCR

発酵液（沈降破片を含む）の試料は、微生物叢の分析のために、発酵開始後、ある一定の間隔で採取した。さらに、4.5 と 5.5 ヶ月目のサンプルも採取した。得られた藍発酵液試料の一部は細胞ペレット・サンプルを得るために 10 分の間 15,000×g で遠心分離された、そして、DNA は抽出キットを使用してサンプル・ペレットから直接抽出した。細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしているプライマーとアダプターが結合したものが、抽出された DNA から遺伝子の PCR による増幅のために使用した。増幅産物は電気泳動後のバンドからキットを使用して抽出、精製した。

#### 次世代シーケンサー（NGS）解析

上記によって得られた 1 回目の PCR アンプリコンは、Illumina 配列アダプターを付けるための PCR を行った。PCR 産物は精製後、健全性と濃度を確認後、16S rRNA 遺伝子ライブラリーは、300-bp リードと MiSeq v3 試薬を用いて Illumina MiSeq プラットホームで配列を決定した。NGS で解析されたシーケンスは QIIME を使用して行った。操作的分類単位(OTUs)は、UCLAST アルゴリズムを用いて 97%のシーケンス類似性に基づいて選択した。rarefaction カーブは、QIIME アルファ多様性分析スクリプトで解析した。OTU テーブルと系統樹から、unweighted UniFrac PCoA（主成分分析）として表される距離マトリックスは QIIME のベータ多様性分析スクリプトを用いて解析した。

#### 4 . 研究成果

##### スクモと発酵液の微生物叢

これまで、インジゴ還元菌がスクモに由来することを示すデータは示されてこなかったが、今回の検討により、スクモに含まれているインジゴ還元微生物としての分類群（genera [属]）*Alkalibacterium*、*Amphibacillus* と *Polygonibacillus* はスクモを起源としていることが明らかになった。そして、それぞれ、これらの細菌がスクモの微生物叢の 0.05%、0.14%と 0.02%を構成していることを示した。高温の灰汁による処置、その後の 26 でのインキュベーション、そして再び 60 への加熱と再び 26 に戻した（2 日目）のメンテナンスの後、解析した微生物叢の主要なメンバーは family Bacillaceae（62.3%）であった。この結果は、最初の 2 回の熱処理に耐性のある細菌が生き残った結果であるものと考えられた。5 日目に、主要なメンバーは、family Bacillaceae（33.3%）と *Alkalibacterium* 属（23.6%）であった。*Alkalibacterium* 属の割合を除いて、2 日目の微生物叢は、5 日目にもと類似していた。スクモ中の *Alkalibacterium* 属の割合が取るに足りなかったが（0.05%）、この観察期間の間に、本属の割合は 5 日目に最も高い値を示した。このことは、本属の細菌が本発酵条件の初期で高い適応性を示すことが伺えた。7 日目に、一度微生物により還元し、発酵液表面で空気中の酸素により再酸化されたことによって生じたと考えられた光沢のない膜が発酵液表面に見られた。8 日目には光沢のある膜が発酵液の表面に現れた。そして、染色の結果浸された綿の布の小片は藍色に染色された。*Amphibacillus* 属は 2 日目に 0.07%観察されたが、この属は 5 日目（0.26%）に増増加し、さらにその相対的なパーセンテージは 7 日目にピークに達した（15.2%）。*Anaerobranca* 属は、5 日目には 0.9%しか存在しなかったが 7 日目に突如増加した（50.1%）。本属の存在比とその時の染色強度を考えると、この属はインジゴの還元に関与しているかもしれない。この属はスクモにも 0.22%の相対的な量が存在することがわかった。7 日目の微生物叢は、9 日目のそれと類似していた。7 日目および 9 日目の発酵液の主要な優先属は、アルカリの環境に適応する嫌気性微生物であった。一方それまで優先していた family Bacillaceae（酸素 metabolizers を含む

かもしれない)の相対的な量は、2日目(62.3%)から7日目(7.3%)に連続的に減少した。4.5ヵ月の発酵液において、family Bacillaceaeの割合は、1.3%にさらに減少した。4.5と5.5ヵ月の発酵液の優先する分類群は *Polygonibacillus* / *Bacillus* 属であり、その時の微生物叢の40%以上を占めた。*Polygonibacillus* / *Bacillus* 属以外のインジゴ還元微生物として、*Amphibacillus* (7.9–8.1%)と *Alkalibacterium* (2.3–3.7%)がこの期間中も存在した。さらにインジゴ還元微生物である可能性がある *Anaerobranca* 属(10.1–11.2%)も存在した。微生物叢の多様性の変化を観察するために、レアファクシションカーブはシーケンスと観察された OUT に基づいて見られた種をもとに作成された。微生物叢の多様性は、スクモの段階から二度の加熱が行われた発酵開始後2日目までの期間減少し、その後5日目まで増加した。最初の種多様性の減少はスクモに高温の灰汁(pH 10.5以上、温度70前後)の導入によって印加される選択的な圧力によるものと考えられた。その後の2日目から5日目までの種多様性の増加はスクモに存在する基質を利用した好気性細菌の増加に因るものと考えられた。多様性は5日目以降9日目の間減少した。この減少は、嫌気性環境への好気性微生物の選択的排除によりものと考えられた。発酵液の種の多様性は、4.5ヵ月まで連続的に増加した。微生物叢の変化の度合いを観察するために、unweighted PCoAの解析を行った。5日目までの2日目からの微生物叢の変化は比較的遅かったが、その後目立った変化が5日目から7日目(インジゴの還元の開始が付随した)までに起こった。その後の7日目から9日目までの微生物叢の変化は、比較的小さかった。これらの解析結果は、発酵の初期の段階における2つのステップがあることを示している。2回目の顕著な変化のステップは嫌気性微生物が優占群となる一方、1回目の顕著な変化は好気性微生物によって支配されるものと考えられる。一方9日目から4.5ヵ月までの微生物叢の変化の間隔は経過時間の長さを考慮すると比較的小さかった。さらに4.5と5.5ヵ月間の微生物叢の変化の差は非常に少なかった。

また、還元能力が短期間で低下した系と長期間還元状態を維持した系を比較することによって発酵液の微生物叢のあるべき姿を通じて、藍発酵液を長期間維持するためにどのようなメンテナンスを施すべきかを明らかにした。このことにより当初の目標である「微生物叢と染色強度の関係を明らかにすることと、発酵のメンテナンスの過程で基質添加のおよぼす影響を検討する。」ことを部分的に達成した。以上の結果から本発酵微生物系の仕込み時の前処理とメンテナン法(攪拌および基質の添加)が微生物叢の変化に直接的な影響を与えることが明確に示された。これらの結果は過去の経験の蓄積によって行われてきた方法で、今回それらの科学的な根拠が明らかになったことの意味は大きいものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Hirota, K., Aino, K., Yumoto, I. *Fermentibacillus polygoni* gen. nov., sp. nov., an alkaliphile that reduces indigo dye. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:2247-2253 (2016) (査読有)

Hirota, K., Okamoto, T., Matsuyama, H., Yumoto, I. *Polygonibacillus indicireducens* gen. nov., sp. nov., an indigo-reducing and obligate alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor for dyeing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:4659-4656 (2016) (査読有)

Okamoto, T., Aino, K., Narihiro, T., Matsuyama, H., Yumoto, I. Analysis of microbiota involved in the aged natural fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33:70

- (2017) (査読有) <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-017-2238-1>
- Nishita, M., Hirota, K., Matsuyama H., Yumoto, I.** Development of media to accelerate the isolation of indigo-reducing bacteria, which are difficult to isolate using conventional media. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 133 (2017) (査読有)  
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-017-2300-z>
- Hirota, K., Nishita, M., Matsuyama H., Yumoto, I.** *Paralkalibacillus indicireducens* gen., nov., sp. nov., an indigo-reducing obligate alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor for dyeing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67:4050-4056 (2017)  
(査読有)
- Hirota, K., Nishita, M., Tu, Z., Matsuyama, H., Yumoto, I.** *Bacillus fermenti* sp. nov., an indigo-reducing obligate alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor for dyeing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68:1123-1129 (2018) (査読有)  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02196/full>
- Aino, K., Hirota, K., Okamoto T, Tu Z, Matsuyama H, Yumoto I** Microbial communities associated with indigo fermentation that thrive in anaerobic alkaline environments. *Front. Microbiol.* 9, 2196 (2018) (査読有)