

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570128

研究課題名(和文) インジゴ還元槽中の微生物叢の機能解明

研究課題名(英文) Functional analyses of microbiota in indigo fermentation

研究代表者

湯本 勲 (YUMOTO, Isao)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・副研究部門長

研究者番号：30358303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、藍染めのインジゴ還元槽について、雑菌汚染の可能性が高い環境下で少なくとも半年以上、インジゴが還元状態である理由を探ることである。この目的を達成するために、数種類の新規インジゴ還元細菌を同定し、新たなインジゴ還元細菌として発表した。また、インジゴ還元微生物を特異的に分離するための培地を勘案し、様々な発酵条件下で発酵した試料について、多様なインジゴ還元菌が存在することを明らかにした。以上の検討結果から、発酵液には多様なインジゴ還元菌が存在し、発酵の環境やその変遷に応じたインジゴ還元菌優先種となることによって色素の還元環境が維持されていることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Although indigo fermentation is managed in the open space, its reduced state is maintained over six months. Normally, microbiota is inevitably changeable and there are many chance of the occurrences of contamination of undesirable bacteria. To clarify the reasons for maintenance of indigo-reducing state in indigo fermentation, we identified several novel indigo-reducing bacteria. In addition, we invented media for the specific isolation of indigo-reducing bacteria and identified diverse indigo reducing bacteria from various indigo fermentation fluids obtained from several places. On the basis of the results, it is suggested that indigo-reducing states are maintained by appearance of appropriate indigo-reducing bacteria accordance to the changes of the indigo fermentation conditions.

研究分野：微生物生理生態学

キーワード：インジゴ還元菌 Alkalibacterium Amphibacillus Bacillus 藍染め 微生物叢

1. 研究開始当初の背景

(1) 藍染めの方法

藍染は含まれている色素であるインジゴを還元し、水溶性にして繊維に浸透させた後、空気に晒すことによって酸化型になって定着するという原理で成り立っている。古来藍染めにおけるインジゴの還元は微生物による還元力に依存した発酵法が用いられてきた。これは、微生物の持つインジゴ還元能力に依存した方法で、この方法は環境に対する負荷が低い反面、良好な微生物叢を即座に形成し、長期間安定的に染色の強度を保つことは、外部からの微生物混入の機会が多い条件で、運用が行われていることと、その維持にはその場に即した状況判断が求められ、藍染の発酵液を運用し維持した経験と勘が重要になってくることから、発酵管理が容易ではない。一方、確実にインジゴを還元することが容易に出来る方法がナトリウムジチオ硫酸($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)による還元法である。これは還元剤を使用し化学的にインジゴ還元を行う方法で、この方法は誰がやっても100%インジゴの還元が出来る。しかし、化学法で使用されるナトリウムジチオ硫酸はその染色液を廃棄する際に、酸化されることによって派生する亜硫酸イオン(SO_3^{2-})の様な有毒物質を直接環境中や排水に放出することになる。また、廃液を排水処理施設に放出するとナトリウムジチオ硫酸自体もその強い還元力から、好気性処理による排水処理システムに大きなダメージを与えることが知られている。また、化学法は染色直後の鮮やかさは発酵法に勝るが、時間が何年か経過すると、発酵法で染色した方が良い色合いになる。

(2) 発酵法による藍染め

藍染めの発酵法は職人の勘と経験によって維持されており、素人が強度の高い染色状態を長期間維持することは困難である。発酵液は開放系で行われているのみならず、染色の際は、外部から布などの出し入れがある。色素の還元が維持されている期間は少なくとも半年、長い場合は一年以上も高い染色状態を維持している。このような微生物叢が簡単に崩壊し易い系で、色素の還元という明確な機能があり、長期間その機能を維持する様な系は他の複合微生物による発酵系において例を見ないものである。通常の微生物の系においては、他の微生物の混入、基質の枯渇、微生物叢の変遷等によって、色素の還元状態を維持出来なくなるはずである。このような特徴を持つ系においてどのような機構で、インジゴが還元状態を維持し続けられるのかを知ることは、生態系維持機構解明や微生物叢の機能維持の点で非常に興味深い。もし、非滅菌系で長期間発酵およびインジゴ還元能について安定化・維持するメカニズムが明らかになれば、非滅菌系の連続微生物生産系に応用することが出来ることが考えられる。

一方、純粋な微生物学的観点から見ると、

藍染めの発酵は、アルカリ性でかつ嫌気的な条件で、このような系で多様な微生物が存在する系は他にはほとんどみられない。もし、原料や、方法論、発酵期間によって、微生物叢が変化するのであれば、それだけ多様な微生物叢が存在し、ひいては多様な微生物が存在する可能性を秘めている。

(3) インジゴ還元微生物

我々がインジゴ還元微生物の研究を始める以前は、1960年代に高原らが行った研究があり、日本藍を原料として発酵液から *Bacillus* 属の微生物であるとの報告があるが、本微生物は研究室や保存機関に保存されておらず、現在入手不可能であることから、当該微生物についてこれから詳細に調べることは不可能である。その後1999年になって Padden らが、ヨーロッパの中性に行われた大青を原料とした発酵液から *Clostridium* 属の新種細菌を分離し、新種として報告している。

2004年以降になって日本藍を原料として発酵液から *Alkalibacterium* 属の新種細菌が立て続けに我々によって報告された。他には大島らによって *Bacillus cohnii* がインジゴ還元能を示すとの特許が出されており(2006年公開)、グラム陽性のいくつかの細菌がインジゴ還元能を有することが、報告されてきた。

2. 研究の目的

これまで、種々のインジゴ還元微生物が報告されてきたが、発酵の初期段階および長期醗酵したインジゴ還元槽の解析結果によると、*Alkalibacterium* 属もしくは *Amphibacillus* 属の細菌は種々の発酵液において優先する場合が多いものと考えられた。しかし、原料となるスクモの種類、発酵の仕込みの方法、発酵のメンテナンス法、染色の運用頻度、発酵期間の長さ等によって微生物叢がどのような多様性と変化を見せるのかは不明のままであった。

まず仕込んでから色素が還元状態になってそれほど日数が経っていない発酵液および長期間還元状態を維持した発酵液から、インジゴ還元菌を実験室で通常用いられる一般的な培地によって分離し同定を行い新規微生物として発表することによって長期間安定化に寄与する可能性のあるインジゴ還元菌の知見を増やすことを目的とする。

藍染めの発酵液は、環境を整えた上で自然の成り行きに任せただけで行っており、上記した様と同じものは存在せず、たとえ同じ発酵液であっても、微生物叢は染色に使用したりすることによって時々刻々変化するものと考えられる。一方、これまでに我々が行った研究において微生物の分離は実験室で頻りに用いられる成分の寒天培地で行っており、実際は培地が微生物の成育に適したものでないと、目的の微生物が分離出来ない可能性がある。そこで、これまで使用してきた原料と仕込みの仕方が異なる試料を使用する

とともに、培地を現場の環境に適した培地を考案し、インジゴ還元微生物の分離を目的として使用し、どの様な微生物が分離出来るかを分離した微生物を同定することによって確認した。

以上の結果を踏まえ、藍染めの発酵がなぜ菌叢の崩壊の機会の多い状況で、長期間インジゴ還元能を維持出来るかについて考察を行った。

3. 研究の方法

研究の前半部分においては、伊達の工房の方法に従って仕込んだ、発酵初期の試料を用い、発酵初期一般的な培地に、インジゴは水に不溶性であることからインジゴの誘導体で水に溶けるインジゴカルミンを培地に入れ、コロニーの周りにハローが形成されたものを分離した。分離した株については、グラム染色、形態観察、基質から酸の産生等を始めた生理生化学的な検査、脂肪酸組成およびイソプレノイドキノン分析等の菌体成分の分析および 16S rRNA 遺伝子解析による系統解析、系統解析結果に基づく系統上近縁菌種の基準株との DNA-DNA 相同性解析によって、これまでに認められている既知種かどうかの判断を行った。

後半では、培地に発酵原料であるスクモのエキスを培地に加えるとともに、仕込みに使用しているすくもと仕込みの仕方が全く異なる発酵液を分離源として、インジゴ還元菌の分離と分離菌の 16S rRNA 遺伝子解析による同定を試みた。

4. 研究成果

(1) *Amphibacillus indicireucens*

長期間運用した藍染めの発酵液を北海道伊達市にある工房から入手し、微生物株をインジゴカルミン含有微生物分離用の培地を用いて分離した (C40 株、N214 株)。分離した 2 菌株は、植物系の高分子であるデンプン、キシラン、セルロース分解能を有していた。また、嫌気条件下で L-アラビノース、D-アラビノース、D-ガラクトース、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、D-ラムノース、キシロース、トレハロース、セロピオース、ラフィノース、シュークロースから酸を産生したが、キシリトール、ソルビトール、トレハロース、マンニトール、*myo*-イノシトールから酸を産生しなかった。生育温度範囲は 17~39 で生育至適温度は 35 であった。生育 pH 範囲は 9.0~12.0 で至適 pH は 10.0 であった。さらに、菌体脂肪酸、16S rRNA 遺伝子解析および DNA-DNA 相同性試験を行った結果、総合的に考えて当該分離 2 株はともに同種に属する新種の微生物であるものと考えられた。本発酵液はメンテナンスにフスマを用いており、本分離菌株はキシランやセルロース分解能を有することとの関連性が推察された。

(2) *Amphibacillus iburiensis*

長期間運用した藍染めの発酵液を北海道伊達市にある工房から入手し、微生物株をインジゴカルミン含有微生物分離用の培地を用いて上記 *A. indicireducens* と類似した N314 株を分離した。*A. indicireducens* と異なる性質は、N314 株はエステラーゼ活性および α -ガラクトシダーゼ活性が無いことと生育温度範囲において *A. indicireducens* が 17~39 なのに対し、N314 株は 26~39 と前者よりも 9 狭い生育温度範囲を示した。さらに、菌体脂肪酸、16S rRNA 遺伝子解析および DNA-DNA 相同性試験を行った結果、総合的に考えて当該分離株は新種の微生物であるものと考えられた。

これまでの我々が行った藍染めの微生物叢の解析結果を考慮すると、藍染めの発酵槽には、性質の少しずつ異なった、お互いに類似した同属の異種細菌が複数種存在していることが理解出来る。このことは、*Alkalibacterium* 属細菌についても当てはまる。このことは、藍の発酵液の特殊な環境が、類似した別種の細菌種を選抜することになったと考えられる。またこの様に性質が少しずつ異なった微生物種がいることは、環境が変化した場合に、それに合わせた機能に優れた微生物が、望む機能を維持するために補う様な緩衝機能を発揮する可能性が考えられた。これまで分離された *Amphibacillus* 属細菌は培養の初発 pH が相当高い pH12 でも最終的には生育するが、実際生育が開始される pH を測定したところ、pH9 の時であることが判明した。このことは藍の発酵液の高い pH は藍の発酵液に望ましくない微生物種を排除している反面、藍の発酵に関与している微生物種が最大の能力を発揮するためには、それらの菌体の周辺の pH は実際の発酵液の pH よりも少し低い pH である方が望ましいことを意味するものと考えられた。また、発酵液全体の pH が高く測定されていても、局所的には低い pH になっているものと考えられた。このことは、発酵液のメンテナンスとして毎日 1 度攪拌することと一致する。すなわち時々攪拌することにより、局所的に酸性に傾いた環境がおこり低い pH でも生育可能な雑菌の繁殖を抑える意味があるものと考えられる。藍染めの発酵液のメンテナンスにフスマが用いられるが、フスマにはキシランやセルロースが含まれていることから、*Alkalibacterium* 属インジゴ還元菌の場合と同様、フスマの添加は *Amphibacillus* 属の細菌を賦活化させるものと考えられる。

(3) *Oceanobacillus indicireducens*

北海道伊達市の工房の方法を用いて研究室で発酵液を調整し、染色出来る状態になって間もない発酵液から、新たなインジゴ還元微生物として A21 株を分離した。本菌株は *Alkalibacterium* 属および *Amphibacillus* 属のインジゴ還元菌とは異なり、植物系高分子で

あるデンプン、キシラン、セルロースの分解能は有しておらず、カゼインやゼラチン等のタンパク質系の高分子の分解能を有していた。また、カタラーゼおよびオキシダーゼ陽性といった一般的な好気性細菌の性質を有していたが、驚いたことにイソプレノイドキノンを含んでいなかった。この様な例は我々の知る限り初めての例である。また、好気条件下でL-アラビノース、D-アラビノース、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、イノシトール、エリスリトール、マンニトール、セロビオース、マルトースから酸を産生した。生育温度範囲は18~48で至適生育温度は39であった(pH9.2)。生育pH範囲は9.0~12.0で至適pHは10.0であった。さらに、菌体脂肪酸、16S rRNA 遺伝子解析およびDNA-DNA 相同性試験を行った結果、総合的に考えて当該分離株は新種の微生物であるものと考えられた。藍染めの発酵液のメンテナンスに糞や水飴が用いられるが、糞と水飴にはそれぞれタンパク質、マルトースが含まれていることから、本種もしくは類似した性質の微生物の増殖を賦活化するものと考えられる。

(4) *Oceanobacillus polygona*

微生物活性の高い藍の発酵液はpHの低下する速度が速い。そこでインジゴ還元インジゴ還元菌以外に、乳酸を産生する微生物を選抜した。北海道伊達市の工房の方法を用いて研究室で発酵液を調整し、染色出来る状態になって6ヶ月以上経過した発酵液を試料としてSA9株を分離した。本菌株カゼインを分解するが、ゼラチン、デンプン、キシラン、セルロースを分解しなかった。好気条件下で、グリセロール、D-リボース、D-キシロース、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、イノシトール、マンニトール、N-アセチルグルコサミン、サリシン、セロビオース、マルトース、シュークロース、トレハロース、キシリトール、D-アラビトールから酸を産生した。生育温度範囲は5~48で至適生育温度は35であった(pH10)。生育pH範囲は7.0~12.0で至適pHは9.0であった。さらに、菌体脂肪酸、16S rRNA 遺伝子解析およびDNA-DNA 相同性試験を行った結果、総合的に考えて当該分離株は新種の微生物であるものと考えられた。本菌株は、タンパク質分解能とマルトースから酸を産生することから、藍染めの発酵液のメンテナンスに用いられる糞や水飴が本菌株を賦活化するものと考えられた。

(5) *Gracilibacillus alcaliphilus*

本菌株も酸産生能に優れた菌株として分離した。試料は伊達の工房の方法により実験室で作成した染色可能な状態から6ヶ月以上経過したものを使用し、SG103株を分離した。本菌株はデンプン、ゼラチンを分解したが、カゼイン、キシラン、セルロースは分解しな

かった。好気条件下で、D-アラビノース、L-アラビノース、D-リボース、D-キシロース、D-グルコース、D-フルクトース、ラムノース、マンニトール、N-アセチルグルコサミン、ラクトース、アミグダリン、アルブチン、サリシン、セロビオース、マルトース、シュークロース、トレハロース、ラフィノース、グリコーゲン、D-アラビトールから酸を産生した。発酵生育温度範囲は13~48で生育至適温度は35であった。生育pH範囲は9.0~10.0で至適pHは9.0であった。さらに、菌体脂肪酸、16S rRNA 遺伝子解析およびDNA-DNA 相同性試験を行った結果、総合的に考えて当該分離株は新種の微生物であるものと考えられた。本菌株は、タンパク質分解能を有し、マルトースから酸を産生することから、藍染めの発酵液のメンテナンスに用いられる糞や水飴が本菌株を賦活化するものと考えられた。

(6) インジゴ還元菌分離培地の検討

これまでの検討から、発酵のステージ等も考慮に入れると様々な状態の藍染めの発酵液が存在し、その多様な発酵液の状態に伴って多様なインジゴ還元菌が存在するものと考えられる。現状においては、それぞれの発酵液に存在するインジゴ還元微生物を確実に分離する培地は無い。そこで藍の発酵液からインジゴ還元微生物を選択的に分離するための培地を検討した。まず培地の固化材をこれまで使用していた寒天に替えて活性酸素の発生がないゲランガムを用いた。生育が速く、コロニーが広がる傾向にあるものが存在すると、生育の遅いコロニーの選抜が困難になることから、低い栄養条件と嫌気培養を採用した。インジゴ還元能のあるコロニーを直ぐに判別するために、インジゴの誘導體で水溶性のインジゴカルミンを指示薬として添加した。今回新たに勘案した培地と、研究室で通常用いられるタンパク質の加水分解物を含み寒天を固化剤として用いた培地をコントロールとしておいた。試料は一年以上の長期間染色能を維持した発酵液を数ヶ月研究室内で維持したものをを用いた。その結果複数種の *Bacillus* 属のインジゴ還元菌を分離することが出来た。それらの多くは16S rRNA 遺伝子配列において既知の種と比較的低い相同性を示すものも含まれていた。これらの中には、一般的な研究室においてよく使用されてきた成分では分離が困難なものもあった。このことから、今回用いた試料において、今回勘案したインジゴ還元微生物分離用培地は従来培地よりも多様なインジゴ還元微生物を分離することが出来ることが示唆された。

(7) 複数の試料に対する分離培地の適用

これまで、主に北海道伊達由来のサンプルもしくは、伊達の工房の仕込み方法に倣って作成した試料を使用して微生物を分離し

てきたが、他の仕込み方法や運用方法による資料を用いてインジゴ還元微生物の分離を試みた。一方使用した培地は上記で検討に用いた。すくもとフスマのエキス分が含まれる培地を使用した。その結果、新規インジゴ還元微生物として、*Oceanobacillus* 属、*Virgibacillus* 属、*Enterococcus* 属、*Facklamina* 属のインジゴ還元菌が分離され、これまで、推測してきた様に、原料、仕込み法、メンテナンス法、発酵期間の違いによって異なるインジゴ還元微生物が存在することを実証することができた。

以上の結果を考慮すると、発酵液自体に多様なものが存在し、その中にさらに多様なインジゴ還元菌が存在し、発酵の環境やその変遷に応じたインジゴ還元菌優先種となることによって色素の還元環境が維持されていることが推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Hirota K, Hanaoka Y, Nodasaka Y, Yumoto I, *Gracilibacillus alcaliphilus* sp. nov., a facultative alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor for dyeing, 査読有, Vol. 64, No.9, 2014, pp. 3174-3180, doi: 10.1099/ijs.0.060871-1

Hirota K, Aino K, Yumoto I, *Amphibacillus iburiensis* sp. nov., an alkaliphile that reduces an indigo dye, 査読有, Vol. 63, No.11, 2013, pp. 4303-4308, doi:10.1099/ijs.0.048009-0

Hirota K, Hanaoka Y, Nodasaka Y, Yumoto I, *Oceanobacillus polygoni* sp. nov., a facultatively alkaliphile isolated from indigo fermentation fluid, 査読有, Vol. 63, No. 9, 2013, pp. 3307-2212 doi:10.1099/ijs.0.048595-0

Hirota K, Aino K, Nodasaka Y, Yumoto I, *Oceanobacillus indicireducens* sp. nov., a facultative alkaliphile that reduces an indigo dye, 査読有, Vol. 63, No.4, 2013, pp. 1437-1442, doi:10.1099/ijs.0.034579-0

Hirota K, Aino K, Nodasaka, Y, Morita N, Yumoto, I, *Amphibacillus indicireducens* sp. nov., a facultatively alkaliphile that reduces an indigo dye, 査読有, Vol. 63, No.2, 2013, pp. 464-469, doi:10.1099/ijs.0.037622-0

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯本 勳 (YUMOTO, Isao)
独立行政法人産業技術総合研究所
生物プロセス研究部門 副研究部門長
研究者番号：30358303

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：