

琉球大学学術リポジトリ

琉球藍の醗酵建に関する研究：(第3報)インジゴ還元細菌について(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 当山, 清善, 川口, 義二, 与那覇, 和雄, Toyama, Seizen, Kawaguchi, Yoshiji, Yonaha, Kazuo メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4199

琉球藍の醗酵建に関する研究

(第3報) インジゴ還元細菌について

当山清善*・川口義二*・与那覇和雄*

Seizen TOYAMA, Yoshiji KAWAGUCHI and Kazuo YONAHA:
Studies on the vat fermentation with Ryukyuai. (3)
On the indigo-reducing bacteria

I 緒言

天然藍による醗酵建は高アルカリ域 (pH 10~12) において行なわれており¹⁾、藍の醗酵には高アルカリ域で生育する微生物が関与するものと考えられる。高原ら^{3,4)}は、徳島産染藍の醗酵建が藍還元細菌 (*Bacillus* 属) によるものであることを報告し、その菌学的特性ならびに還元機構を明らかにしている。しかしながら琉球藍の醗酵建に関与する微生物についての知見はこれまで殆んど得られていない。琉球藍の醗酵建においても、微生物学的管理指針の確立が望まれている。藍還元力を有する微生物の特性を明らかにすることは琉球藍の醗酵建を解明する上においても極めて重要である。筆者ら²⁾は前報において琉球藍の醗酵液中に藍還元菌が存在することを報告した。本報においては、琉球藍の醗酵液より藍色素 (インジゴ) を還元する細菌の検索・分離を行ない、インジゴ還元力ならびに培養条件等について検討した結果を報告する。

II 実験方法

- (1) 供試泥藍：本実験には、沖縄本島北部の本部町伊豆味で製造された1975年夏藍を用いた。
- (2) インジゴ還元細菌の分離法と培地：培地組成は0.1%ポリペプトン、0.02%酵母エキス、0.5%可溶性デンプン、0.05%リン酸一カルウム、0.2%リン酸二カルウム、0.1%塩化ナトリウムおよび1.2%炭酸ナトリウム (使用時添加) を含む液体培地 (pH10.5) である。菌の分離および保存用培地は、上記液体培地に寒天 (1.8%) を加えたものである。インジゴ還元菌のスクリーニングは、液体培地に友種 (醗酵した藍膠) 一白金耳接種し、30°Cで24~48時間振盪して集積培養を数回くり返すことにより行なった。集積培養の後、常法通り平板培養を行ない生育菌の純粋分離を行なった。分離された細菌は寒天斜面培地に採り保存した。
- (3) インジゴ還元力の測定：集積培養菌あるいは純粋分離の培養は上記液体培地を用い、30°Cで36時間振盪して行ない、遠心分離 (8,000rpm, 20min) により菌体と培養液を分離した。培養液はMillipore filter HAで無菌濾過し、菌体は0.05%炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。菌体による

* 琉球大学農学部農芸化学科

インジゴ還元力は、ツンベルグ管を用いて次のように測定した。ツンベルグ管(VIDREX, 15/35)の
主室に、洗浄菌体、超音波処理した1%インジゴ懸濁液0.02 mlおよび培養液(あるいは酵母エキス)
2.0 mlおよび水を加えて全容4.0 mlとした。菌体量は610 m μ における吸光値が0.8になるよう調整し、
反応液のpHは炭酸ナトリウムを用いてpH 10.0に調整した。ツンベルグ管の副室には 10^{-3} M 2, 3, 5
トリフェニルテトラゾリウムクロリド(T. T. C.)溶液を10 ml入れた。還元反応は、ツンベルグ管を
ポンプで廃気し、窒素ガスで置換した後、30°Cの暗所で40時間行なった。反応終了後、副室のT. T.
C.溶液を主室の反応液に混和して攪拌し、速やかに酢酸エチルを5.0 ml加えて激しく抽出処理を行な
った。T. T. C.は、インジゴ還元菌によって還元された反応液中のロイコインジゴにより還元されて赤
色のトリフェニルフォルマザン(T. P. F.)となるため、インジゴ還元力は析出したT. P. F.の
485 m μ における吸光度を測定して表示した。なお、インジゴは和光純薬製特級、酵母エキスはDifco
社製を使用した。

III 結 果

1 集積培養菌によるインジゴの還元

Table 1は合成培地に琉球藍の醗酵膠一白金耳を接種し、振盪培養により4回植継ぎを行なって得
られた集積培養菌体によるインジゴ還元力を測定した結果である。菌体あるいは培養液のみの反応系
ではインジゴ還元力が認められず菌体と共に培養液が存在する反応系がインジゴを還元することがわ
かった。インジゴ還元反応が集積培養菌体の培養液を添加することによって促進されることは培養液
中に還元を促進する因子が含まれていることを示している。Table 2は、菌体に培地組成すなわちポ
リペプトン、酵母エキスおよび可溶性デンプンを加え還元反応を行った結果である。インジゴの還元反
応は菌体にペプトンあるいは酵母エキスを添加した反応系でのみ起り、ペプトンあるいはデンプンを含む
反応系での還元力はみられなかった。従ってインジゴの還元反応を促進する因子が培養液中ならびに
酵母エキス中に存在することが明らかとなった。

2 インジゴ還元細菌

琉球藍の醗酵膠の集積培養を平板培養した結果、多くの細菌が分離された。代表的な分離菌株につい
てインジゴの還元力を調べたのがFig. 1である。各菌体のインジゴ還元力は集積培養菌体の還元力に
対する比率で示した。各菌体の還元力は酵母エキス存在下でのみ発現した。集積培養菌体よりも高い還
元力を有する分離菌株があり、特にNo. 156およびNo. 212菌体が最も高い還元力を示した。比較的高い還
元力を示したNo. 156菌体を以下の実験に供した。

3 集積培養菌とNo. 156菌株の生育に及ぼすpHの影響

Fig. 2は、集積培養菌および分離菌であるNo. 156菌株の生育と培養初発pHとの関係を調べた結果
である。培養は液体培地を用い30°Cで36時間振盪して行なった。図から明らかなように、両菌共pH
7以下あるいは12以上では全く生育が認められず、pH 8~11の範囲で生育した。生育の最適pHは、
No. 156菌株ではpH 9~10で、集積培養菌ではpH 10~11にあった。両菌株共に培養後のpHは低
下した。

Table 1. Reduction of indigo by cells of the mash of Ryukyuai grown in a synthetic medium

A loopful mash of Ryukyuai was inoculated on a synthetic medium (pH10) described in the legend for Fig 2. After cultivation for 48 hr at 30°C, the culture medium was centrifuged at 8000 rpm for 20 min. The supernatant solution was filtered through a HA Millipore filter. The precipitate was washed twice with 0.05 % Na₂CO₃ and used as washed cells. The activity of indigo reduction with the supernatant and the washed cells were determined as follows. A Thunberg tube was contained 2.0 ml of supernatant, 0.02 ml of 1.0 % indigo suspension treated with ultrasonic and washed cells in the main room (4.0 ml), and 1.0 ml of 10⁻³M 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (T. T. C.) solution in the second one. The reaction mixture was adjusted pH to 10.0 by Na₂CO₃. Washed cells were suspended in the reaction mixture at a final cell concentration of 0.8 O. D. unit at 610m μ . After the tube was evacuated and introduced with N₂ gas, the reaction was carried out for 40 hr at 30°C in the dark. To the reaction mixture in the main room, T. T. C. was added. T. T. C. was reduced to form triphenylformazan by the reduced indigo (leuco indigo) in the reaction mixture. The triphenylformazan formed was rapidly extracted with 5.0 ml of ethylacetate and the absorbance was measured at 485 m μ .

Reaction system	Reduced Indigo (OD at 485 m μ)
Cells	0.034
Cells + Yeast extract	0.309
Cells + Peptone	0.030
Cells + Soluble starch	0.006
Yeast extract	0.060
Peptone	0.001
Starch	0.008

Table 2. Effect of the medium component on the indigo-reducing activity of the washed cells

The indicated substances were used instead of the supernatant of the culture broth. The other conditions were the same as Table 1.

Reaction system			Reduced Indigo (OD at 485 m μ)
Indigo	Cells	Supernatant	
+	+	+	0.369
+	+	-	0
+	-	+	0
-	+	+	0

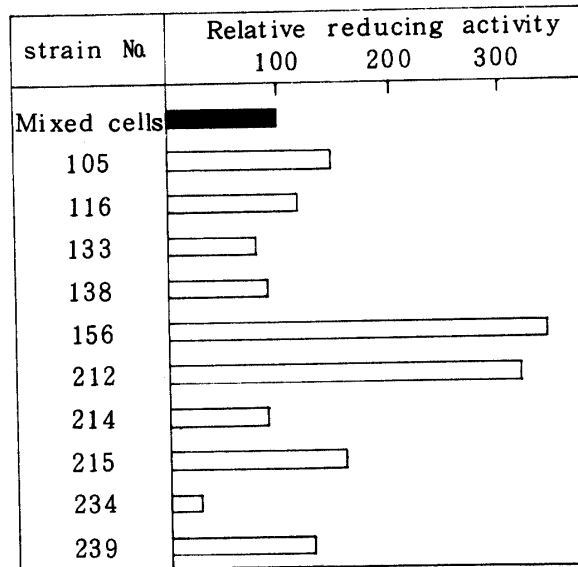


Fig. 1. Screening of indigo-reducing microorganism

Reaction mixture (4.0 ml) in the main room of a Thunberg tube was contained 1.0% Difco yeast extract, 5×10^{-3} % indigo and washed cells of the indicated strain. The other conditions were the same as Table 1. Mixed cells were obtained by cultivation of a loopful mash of Ryukyuai in a synthetic medium described in the legend of Table, 1

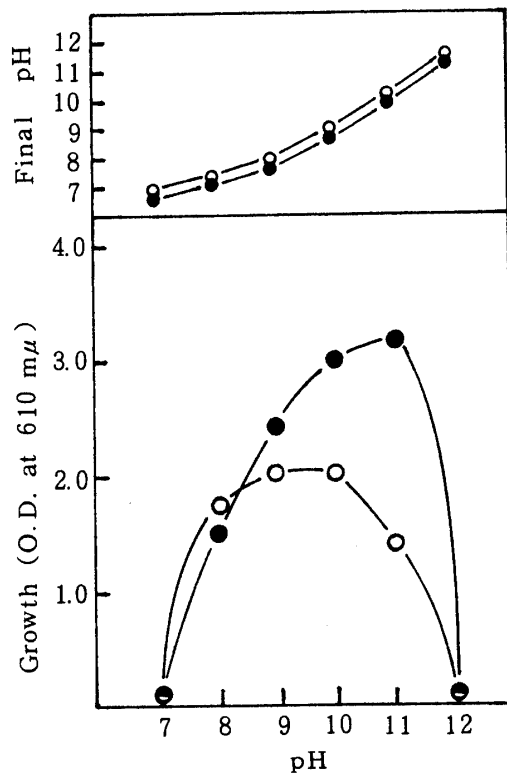


Fig. 2. Effect of initial pH on the growth of mixed cells and strain No. 156

A loopful mash of Ryukyuai and strain No 156 were cultivated in a medium containing 0.1% polypeptone, 0.02% Difco yeast extract, 0.5% soluble starch, 0.2% K_2HPO_4 , 0.05% KH_2PO_4 , and 0.1% NaCl. The pH of the medium was adjusted by Na_2CO_3 (pH 8-10) or Na_2CO_3 and NaOH (pH 12) sterilized separately. The cultivation was carried out for 36 hr at 30°C under continuous shaking. The cell mass was determined from the absorbance at 610 $m\mu$. Mixed cells (●), Strain No 156 (○)

4 No 156 菌株によるインジゴの還元

a) インジゴ還元反応を促進する因子：No 156 菌株の菌体によるインジゴの還元反応は酵母エキスによって促進される。Fig. 3はNo 156 菌株の菌体によるインジゴの還元力と酵母エキスとの関係を調

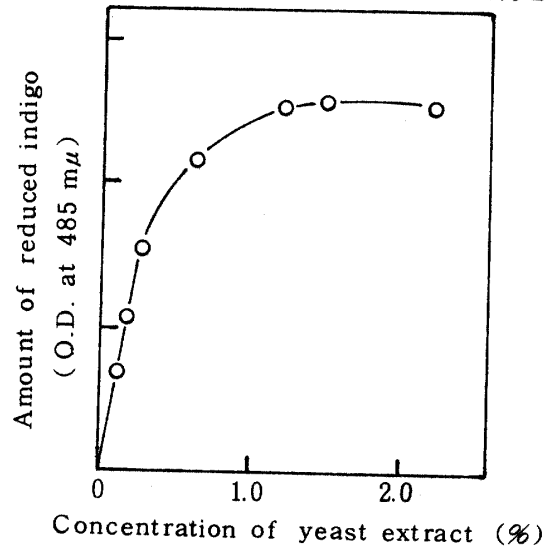


Fig. 3. Effect of yeast extract on the reduction of indigo by strain No 156

Reaction mixture (4.0 ml) in the main room of a Thunberg tube was contained the indicated concentration of Difco yeast extract, 5×10^{-3} % indigo, washed cells of strain No 156 adjusting pH to 10.0. Washed cells were suspended in the reaction mixture at a final cell concentration of 0.8 OD unit at 610 $m\mu$. The other conditions were the same as Table 1.

べた結果である。図から明らかなように、菌体による還元反応は酵母エキスによって著しく促進され、最高の還元力は酵母エキス 1.0~1.5% 添加した反応系で得られた。前報²⁾において、反種、即ち良く醗酵した藍膠を攪拌して酸化させた後、遠心分離によって得られた友種の上澄み液が藍還元反応を促進することが明らかになったので、次に上澄み液がNo 156 菌株の菌体によるインジゴの還元反応を促進するかどうかを調べた。Millipore filter HA を用いて無菌濾過した上澄み液を添加してNo 156 によるインジゴの反応を行った。Fig. 4 は、上澄み液の添加量とインジゴ還元力との関係を示したものです。図から明らかなように、No 156 菌株の菌体に友種の上澄み液を加えた場合にもインジゴの還元が起こることがわかり、友種の上澄み液、即ち醗酵した藍膠中にも還元反応を促進する因子が存在することが

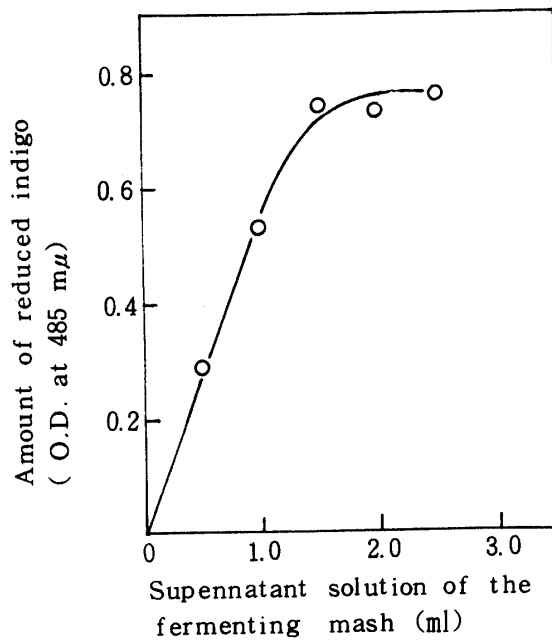


Fig. 4. Effect of supernatant of the fermenting mash of Ryukyuai on the reduction of indigo by strain No 156

The fermenting mash oxidized with stirring was centrifuged at 8000 rpm for 20 min. The supernatant was filtered through a HA Millipore filter and added to the reaction mixture instead of yeast extract. The other conditions were the same as Fig. 3

判明した。なお、酵母エキス或は上澄み液存在下で No 156 菌株の菌体量とインジゴ還元力に相関関係があることが確認された。また、インジゴの還元反応は40～48時間で最高に達することがわかった。

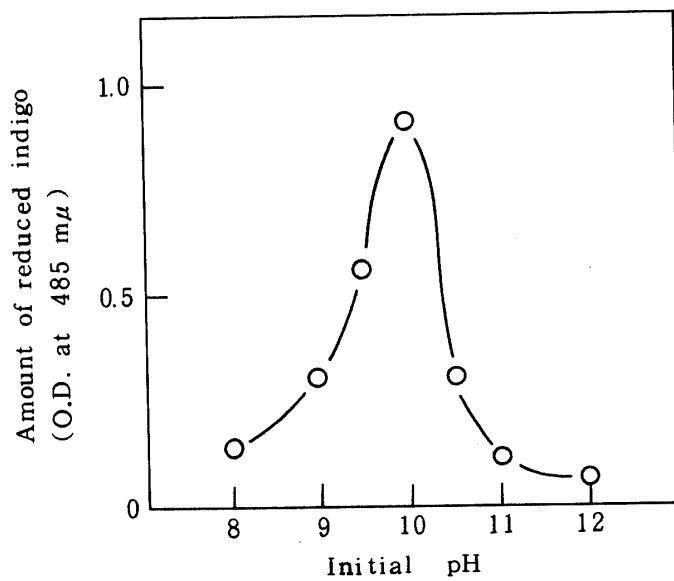


Fig. 5. Relationship between initial pH and reduction of indigo by strain No 156

The pH of the reaction mixture containing 1.5% Difco yeast extract was adjusted by Na_2CO_3 (pH 8–10) or Na_2CO_3 and NaOH (pH 12). The other conditions were the same as Fig. 3.

b) インジゴの還元反応に及ぼすpHおよび温度の影響：インジゴの還元型（ロイコインジゴ）はアルカリ溶液に可溶であることから、Na 156 菌株の菌体によるインジゴ還元反応においてはpHの影響が極めて大きいものと考えられる。Fig. 5は、Na 156 菌株の洗浄菌体に酵母エキスを1.5%加え、炭酸ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを用いて反応液のpHを8～12に調整してインジゴ還元力を測定した結果である。図から明らかなように、インジゴの還元力はpH 10.0の反応液で最も高い値が得られた。Fig. 6はNa 156 菌株の菌体によるインジゴの還元反応に及ぼす温度の影響を検討するため10～50℃で24～48時間、インジゴの還元反応を行なった結果である。図から明らかなように、還元反応の最高温度は30～40℃にあり、20℃以下あるいは50℃以上においてはインジゴの還元は認められなかった。

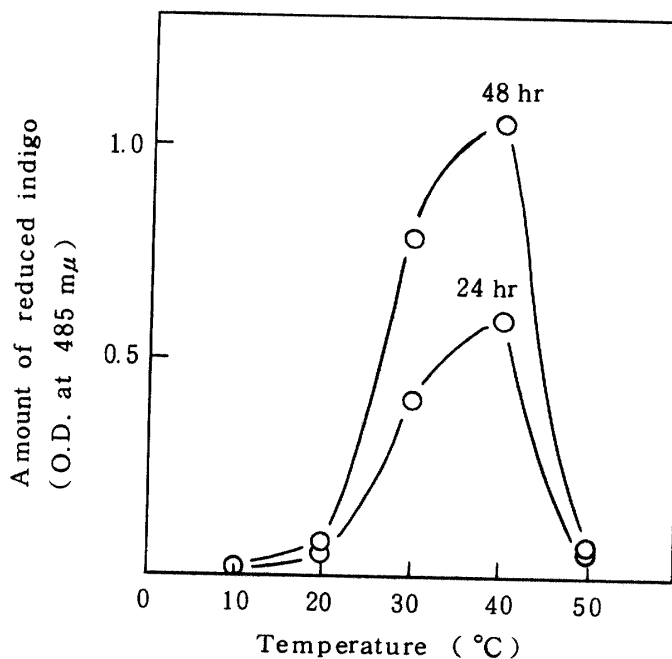


Fig. 6. Relationship between temperature and reduction of indigo by strain No 156

The reaction mixture containing 1.5% Difco yeast extract was incubated for 24 to 48 hr at the indicated temperature. The other conditions were the same as Fig. 3.

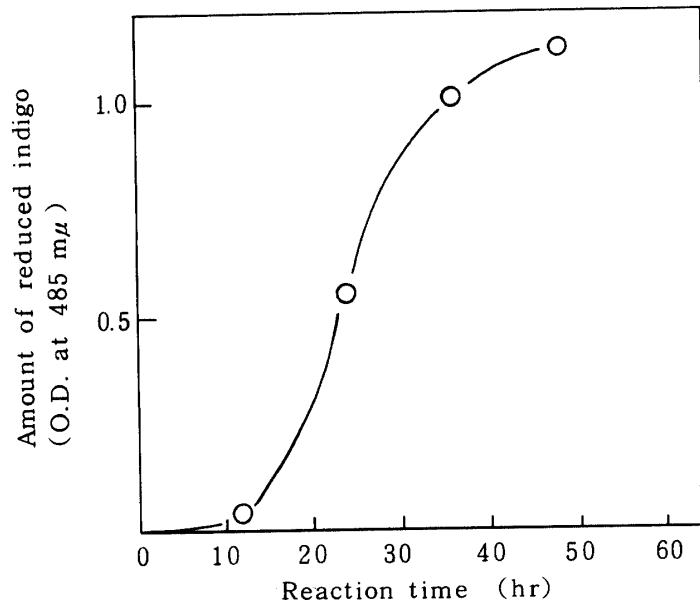


Fig. 7. Time course of reduction of indigo by strain Na 156

The reaction mixture containing 1.5% Difco yeast extract was incubated for 12 to 60 hr. The other conditions were the same as Fig. 3.

IV 考 察

高原ら^{3,4)}は、徳島産靛藍の醗酵建に關与する藍還元細菌 S-8 号菌を分離し、藍玉含有培地にのみ特異的に生育することを報告している。本研究において、琉球藍の醗酵醪からアルカリ性の合成培地で良好に生育する細菌 Na 156 菌株が分離された。琉球藍醗酵醪(友種)の集積培養菌体および Na 156 菌株の培養菌体についてインジゴ還元能を調べた結果、インジゴの還元反応は醗酵醪液あるいは培養液存在下でのみ進行した。還元反応は、反応系に酵母エキスを添加することにより著しく促進された。従って、酵母エキス中に菌体によるインジゴ還元反応を促進する因子が存在し、本促進因子は琉球藍の醗酵醪中にも存在することが明らかになった。本促進因子は透析用セルローズチューブによって透析され得る低分子物質である。また、実際の醗酵建における最も重要な因子は藍醪の pH であると思われる。Na 156 菌株の菌体によるインジゴ還元反応における最適 pH、ならびに本菌体の生育増殖のための最適 pH は 10 附近であるが、前報¹⁾で報告した琉球藍の醗酵過程における藍醪の最適 pH (11.0~11.5) より幾分低い。しかし実際の醗酵建においては、醗酵と共に藍醪の pH が徐々に低下してゆき、藍醪の pH が 10 附近まで低下し始める頃から藍色素の還元が始まることを考えると興味深い結果である。還元された藍色素(ロイコインジゴ)の安定性ならびに藍醪の雑菌による汚染防止のためには pH 11.5~12.0 の高アルカリ側が好適であるが、醗酵に關与する微生物の生育増殖および藍色素の還元反応は pH 10 附近の低アルカリ側が適しており、実際の現場においては経験と勘によってその両者のバランスを保ちながら醗酵が管理されているものと推測される。今後、インジゴ還元細菌 Na 156 菌株の同定とその特性を調べると共にインジゴの還元反応を促進する因子の本体を明らかにし、実際の琉球藍の醗酵過程との関連性等についてさらに検討したい。

V 要 約

琉球藍の醗酵醪よりインジゴを還元する微生物の検索分離を行ない次の結果を得た。分離されたインジゴ還元力の強いNa 156菌株はpH 9～10で最も良い生育を示し、pH 7以下では生育しない好アルカリ性細菌であった。Na 156菌株の洗浄菌体によるインジゴの還元には酵母エキスの添加が極めて有効であった。インジゴ還元反応は、嫌気的条件下において、pH 10.0、30～40℃、40～48時間で最も良い結果が得られた。さらに、酵母エキス中に含まれるインジゴの還元因子は、琉球藍の醗酵醪中にも存在することが判明した。

文 献

1. 川口義二, 与那覇和雄, 大城志津子, 当山清善 1976 琉球藍の醗酵建に関する研究, 第1報 醗酵過程に及ぼす諸因子について, 琉大農学報, 23: 205～219
2. 川口義二, 与那覇和雄, 当山清善 1977 琉球藍の醗酵建に関する研究 第2報 醗酵促進物質について, 琉大農学報, 24: 243～251
3. 高原義昌, 田辺脩 1960 細菌による藍の工業的還元に関する研究, 醗工誌, 38: 293～299, 329～331, 440～444
4. 高原義昌, 高崎義幸, 田辺脩 1962 細菌による藍の工業的還元に関する研究, 醗工誌, 40: 80～84, 103～107

Summary

Isolation of indigo-reducing microorganism from the fermenting mash of Ryukyuai was studied. The results obtained were as follows. The isolated strain No. 156 showing the highest reduction of indigo cannot grow in neutral media, but well in alkaline media (pH 9-10). Indigo reduction by washed cells of the strain was promoted effectively by the presence of yeast extract. The optimum conditions for the reduction of indigo were as follows: pH; 10.0, reaction time; 40-48 hr, temperature; 30°C, and without oxygen. It was suggested that a reducing factor was presented in yeast extract and the fermenting mash of Ryukyuai.