

# 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2報)醗酵促進物質について(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: 川口, 義二, 与那覇, 和雄, 当山, 清善, Kawaguchi, Yoshiji, Yonaha, Kazuo, Toyama, Seizen メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4241">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4241</a>

# 琉球藍の醱酵建に関する研究

## (第2報) 醱酵促進物質について

川 口 義 二<sup>\*</sup>・与那覇 和 雄<sup>\*</sup>・当 山 清 善<sup>\*</sup>

Yoshiji KAWAGUCHI, Kazuo YONAHA and Seizen TOYAMA:  
Studies on the vat fermentation with Ryukyuai. (2) On the  
fermentation-stimulating substances.

### I 結 言

筆者らは、前報<sup>3)</sup>において、琉球藍の醱酵建に関する諸因子について検討し、醱酵温度、澱粉質物の添加効果、さらにすでに良く醱酵した藍膠を友種として添加することにより醱酵が促進されることを明らかにした。これらの結果、琉球藍の醱酵建においても、徳島産菜藍の醱酵建と同様に微生物の関与が示唆された。一般に微生物の生育には炭素源および窒素源などの栄養源が必要とされているが、天然物である泥藍中には両物質共に幾分含まれているものと思われる。しかし、古来からの伝統的な琉球藍の醱酵建法<sup>2)</sup>によれば、仕込み時あるいは醱酵過程において醱酵促進剤として澱粉質物や泡盛などが補添されている。菜藍の醱酵建においても澱粉質物などの炭素源や酵母エキスなどの窒素源の補添が効果的であるとされており、<sup>4,5)</sup>これらの添加物質が醱酵に与える影響は極めて大きいものと考えられる。さらに琉球藍の醱酵建においては、独特の手法として伝統的に泡盛が添加されているが、その添加意義については未だ解明されていない。醱酵建に及ぼす添加物質の影響を解明することは、琉球藍の醱酵管理技術を確立するにあたって極めて重要である。本報では、琉球藍の醱酵建において、醱酵を促進する物質を明らかにするため、醱酵に及ぼす炭素源、窒素源、および無機塩などの影響について調べると共に、琉球藍の醱酵建に古来から使用されている泡盛の添加効果について検討を加えた。さらに、友種の添加効果は醱酵に関与する微生物によるものであることを示唆する結果を得たので報告する。

### 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1976年冬藍を用いた。
- (2) 500ml仕込みによる醱酵建法：仕込み液（500ml）の組成は、15%泥藍、0.2%可溶性デンプン、0.1%ポリペプトン、および5%友種（すでに良く醱酵した藍膠）とした。仕込み液は、2N水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 11.5～12.0（醱酵が十分に進行した頃から徐々にpHを高くした）に調整しながら30℃で醱酵させた。仕込み液の液面比（直径/深さ）は1/2とした。
- (3) 醱酵過程における還元藍の定量：醱酵過程における還元藍の測定は、前報にしたがって次のように行なった。仕込み液（藍膠）の攪拌を行なう前に、液面下5cmの処からピペットで上澄み液を0.2ml採取し、 $10^{-3}$ 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2.0ml中に速やかに加え

\* 琉球大学農学部農芸化学科

静かに混和した。T. T. C. は上澄み液中の還元藍によって還元され赤色のトリフェニルフォルマゼン (T. P. F.) となるため、上記混液に酢酸エチル 5.0 ml を加えて T. P. F. の抽出処理を行なった。醱酵過程における藍醪中の還元藍は、本抽出液を用いて T. P. F. の吸収極大値である 485 m $\mu$  における吸光度を測定して定量した。

(4) 友種の上澄み液と沈澱部分の調製：すでに良く醱酵した藍醪、すなわち友種の上澄み液と沈澱部分の調製は次のように行なった。友種を激しく攪拌して空気酸化させた後、遠心分離 (8,000 rpm, 20 min) を行ない上澄み液と沈澱部分に分離した。上澄み液は、Millipore filter HA を用いて無菌ろ過処理した。沈澱部分は、0.05% 炭酸ナトリウム溶液で 2 回洗浄した後、元の友種と同容量に懸濁した。

(5) 友種の沈澱部分の藍還元力測定：友種の沈澱部分の藍還元力は、ツンベルグ管 (Vidrex, 15/35) を用いて次のように測定した。ツンベルグ管の主室に友種の沈澱物懸濁液 2.0 ml, 友種の上澄み液あるいは水 2.0 ml, および超音波処理した 1% インジゴ懸濁液 0.1 ml を入れ、炭酸ナトリウムにて pH 10.5 に調整した。ツンベルグ管の副室には 2 N 水酸化ナトリウム溶液を 2.0 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 で 60 時間行なった。反応の停止は、副室の水酸化ナトリウム溶液を反応液に加えて行なった。本液を 1 時間静置した後、速やかにピペットで還元藍を含む上澄み液を 0.2 ml 採取し還元藍を測定した。藍還元力は、T. P. F. の吸収極大値である 485 nm における吸光度値を用いて表わした。

### III 結果と考察

#### 1. 炭素源の添加効果

前報<sup>3)</sup>において、醱酵促進剤として小麦粉を添加して 500 ml 仕込みによる醱酵建を行ない、その添加効果はすでに明らかにしたが、小麦粉は藍の醱酵に関与している微生物の生育増殖のための炭素源、あるいは窒素源として役立っているものと考えられる。したがって、醱酵に及ぼす炭素源の効果を調べるため、各種糖類およびアルコールを加えて醱酵建を行なった。Fig. 1 は、ポリペプトンを 0.1% 加えた仕込み液に各種の炭素源を 0.2% 加えて醱酵建を行なった結果である。図から明らかなように、炭素源無添加の仕込み液では全く還元状態が認められなかったが、ブドウ糖、可溶性デンプン、蔗糖、およびエチルアルコールを添加した仕込み液は還元状態が得られ、これらの炭素源の添加は極めて効果的であることがわかる。琉球藍の醱酵建においては、独特の手法として伝統的に泡盛が添加されている。しかしその添加意義は全く不明であったため、エチルアルコールが醱酵に極めて有効であることが確認されたことは意義深い。

#### 2. アルコールの添加効果

エチルアルコールが琉球藍の醱酵に効果的であることがわかったため、次に各種のアルコールを仕込み液に加えて醱酵の促進効果を調べた。Fig. 2 は、ポリペプトンを 0.1% 加えた仕込み液に各種アルコールを 0.2% 添加して醱酵建を行なった結果である。図から明らかなように、泡盛とエチルアルコールは添加効果が極めて良好であることがわかる。泡盛はエチルアルコールの濃度に換算して添加されているため、泡盛中のエチルアルコール成分が醱酵を促進しているものと考えられる。プロピルアルコールおよびブチルアルコールも各々添加効果が認められたが、その醱酵促進効果は泡盛やエチルアルコールに比較して低い。メチルアルコールおよびアミルアルコールは醱酵促進効果が全くみられなかった。また、泡盛やエチルアルコールを添加して醱酵建を行なった場合、ブドウ糖や可溶性デンプンあるいは小麦粉などを添加した場合に比べて、藍醪の pH 低下率が全般に低いことがわかった。このことより、

泡盛を用いた醗酵建法においては、pHの異常低下による腐敗の危険性が少ないという利点も考えられる。泡盛中のエチルアルコール成分が琉球藍の醗酵を促進することが本研究により明らかになったが、泡盛あるいはエチルアルコールがどのように醗酵過程に役立っているかは不明であり、今後さらに検討する必要がある。

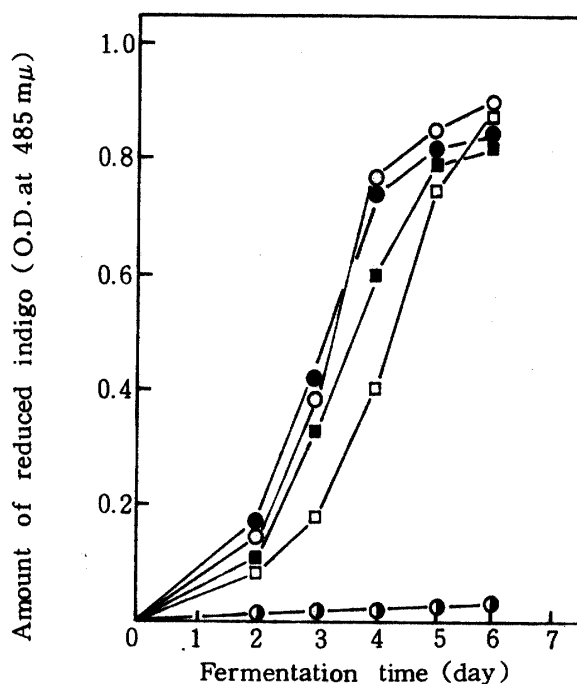


Fig. 1. Effect of carbon sources on the fermentation

The fermentation (500 ml) was carried out with 15% Ryukyuai, 5% stock mash (starter), 0.1% polypeptone and the indicated carbon sources at 30°C. The fermentation was performed by adjusting pH to pH 11.5–12.0 with 2N NaOH once a day. The amount of reduced indigo was estimated as follows. To 2.0 ml of  $10^{-3}$  M 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (T.T.C.), 0.2 ml of supernatant of the fermenting mash was added. T.T.C. was reduced to form triphenylformazan (T.P.F.) by the reduced indigo in the fermenting mash. T.P.F. extracted with 5.0 ml of ethylacetate was determined from the absorbance at 485 nm. —○— : none, —□— : 0.2% soluble starch, —●— : 0.2% glucose, —■— : 0.2% ethylalcohol

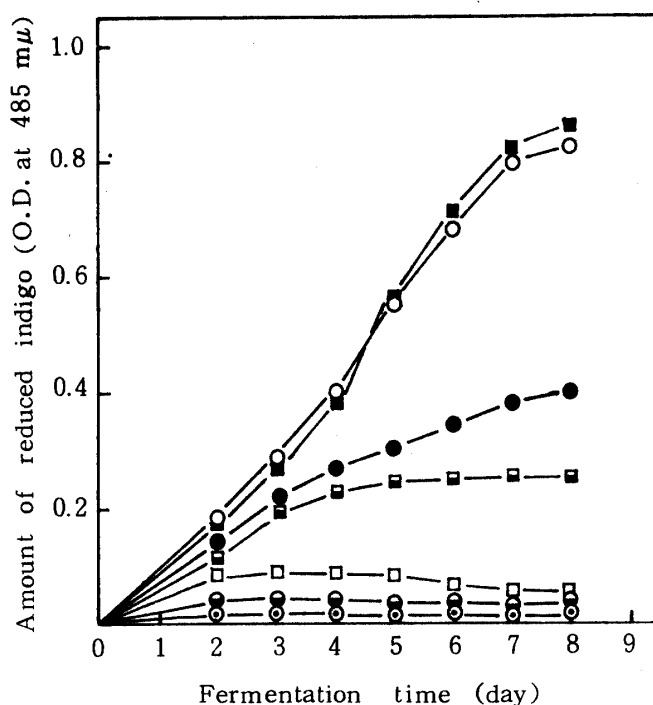


Fig. 2. Effect of alcohols on the fermentation

The fermentation was carried out in the medium (500 ml) containing 15% Ryukyuai, 5% stock mash, 0.1% polypeptone and the indicated amount of various alcohols at 30°C. The reduced indigo was determined as described in Fig. 1. —○— : none, —●— : 0.2% methylalcohol, —○— : 0.2% ethylalcohol, —●— : 0.2% n-propylalcohol, —□— : 0.2% n-butylalcohol, —□— : 0.2% isoamylalcohol, —■— : Awamori as 0.2% ethylalcohol

### 3. 窒素源の添加効果

Fig. 3は、可溶性デンプンを0.2%加えた仕込み液に各種窒素源を0.1%添加して醗酵建を行なった結果である。図から明らかなように、ポリペプトン、酵母エキスなどの有機窒素源の添加は醗酵の促進に有効であるが、硫酸アンモニウムや硝酸ナトリウムなどは阻害的であることがわかる。また、炭素源無添加の場合には醗酵がほとんど進まなかった (Fig. 1)が、炭素源を添加すれば特に窒素源を添加しなくても緩やかながら醗酵が進行している。このことは、古来からの伝統的手法とされる泡盛だけの添加による醗酵建法との関連において、興味深い結果である。しかし、泡盛中には窒素源となり得る物質が含まれていないため、泡盛を用いて醗酵建を行なう場合には、ポリペプトンや酵母エキスなどの補添が効果的であると思われる。

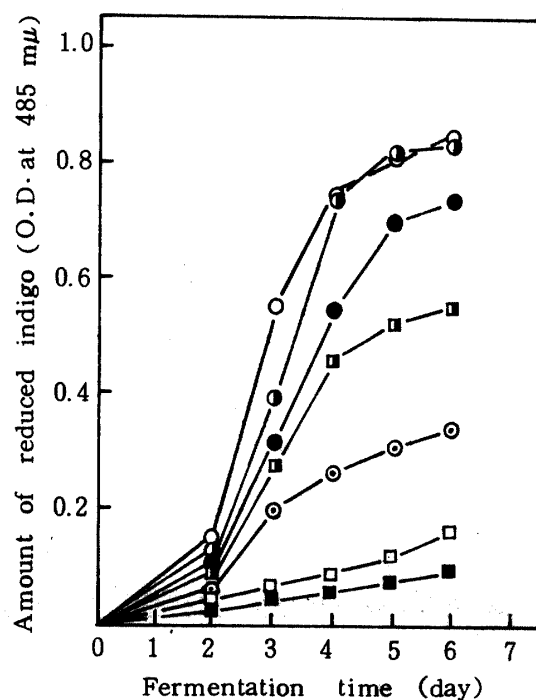


Fig. 3. Effect of nitrogen sources on the fermentation

The fermentation was carried out in the medium (500 ml) containing 15 % Ryukyuai, 5 % stock mash, 0.2 % soluble starch and the indicated amount of various nitrogen sources at 30 °C.

The reduced indigo was determined as described in Fig. 1. —○— : none, —●— : 0.1 % yeast extract, —○— : 0.1 % polypeptone, —●— : 0.1 % sodium glutamate, —□— : 0.1 % urea, —□— : 0.1 % ammonium sulfate, —■— : 0.1 % sodium nitrate

#### 4. 金属イオンの影響

日本の藍の代表とされる徳島産染藍は堆積醗酵法により製造されるが、泥藍は山間部の高硬度の水と多量の粗石灰を用いて沈澱法により製造されている。したがって製造過程において泥藍に混入した種々の金属イオンは醗酵過程にも影響を及ぼすものと考えられるため、次に醗酵に及ぼす金属イオンの影響について検討した。Fig. 4 は、カルシウム、ナトリウム、マグネシウムなどを除く種々の金属塩を各々  $10^{-3}$  M 添加して醗酵建を行なった結果である。図から明らかなように、水銀、銅、亜鉛、ニッケルなどの金属イオンは醗酵に阻害的であることがわかる。特に水銀は、藍膠の pH 低下もほとんど見られず、醗酵を完全に阻害することがわかった。したがって、藍草栽培時の農薬汚染や泥藍製造時における粗石灰の過剰使用などに注意を払い、醗酵に有害なこれらの金属イオンの泥藍への混入を防ぐ必要がある。一方、鉄、マグネシウムなどの金属イオンは添加効果も認められないため、仕込み時にこれらの金属塩を補添する必要はないものと思われる。

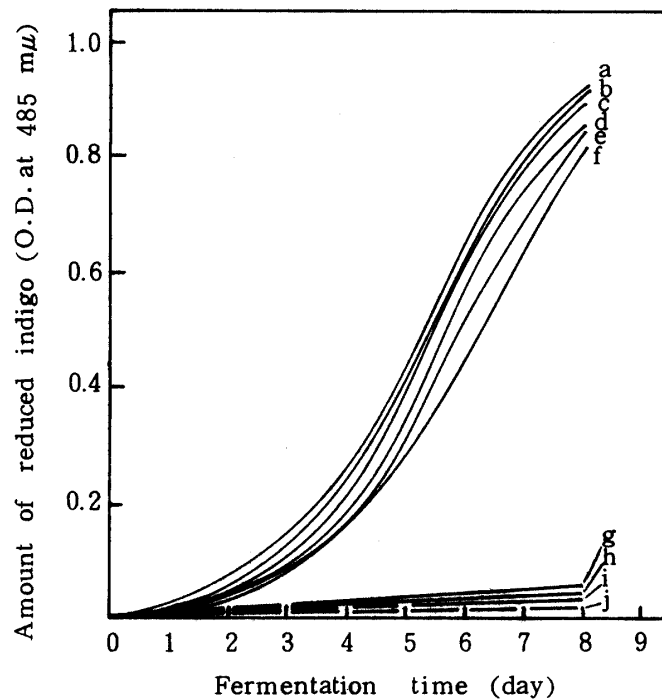


Fig. 4. Effect of metal ions on the fermentation

The fermentation was carried out in the medium (500 ml) containing 15% Ryukyuai, 0.1% polypeptone, 0.2% soluble starch, 5% stock mash and various metal compounds ( $10^{-3}$  M) at 30°C. The reduced indigo was determined as described in Fig. 1. a: none, b:  $\text{FeCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , c:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , d:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , e:  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , f:  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , g:  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , h:  $\text{ZnCl}_2$ , i:  $\text{CuCl}_2$ , j:  $\text{HgCl}_2$ .

##### 5. 友種の上澄み液と沈澱部分の添加効果

醗酵建をより早く確実にこなうためには、仕込み時にすでに良く醗酵した藍醪を友種として添加することが極めて有効であることを前報<sup>3)</sup>で報告した。友種の醗酵促進因子について調べるため、友種の上澄み液と沈澱部分を仕込み液に添加して醗酵建を行なった。Fig. 5は、無菌ろ過処理した友種の上澄み液、あるいは沈澱部分を仕込み液に対して5%添加して醗酵建を行なった結果である。図から明らかなように、上澄み液の添加効果はほとんど認められず、沈澱部分が醗酵を促進していることがわかる。

##### 6. 友種の沈澱部分の藍還元力

Fig. 5で示したように、友種の沈澱部分が醗酵を促進することがわかったため、次に沈澱部分を用いて藍色素の還元反応について検討した。Table 1は、インジゴに友種の沈澱部分、あるいはその沈澱部分を120°Cで20分間処理したものを加えて藍色素の還元反応を行ない、沈澱部分の藍還元力を測定した結果である。表から明らかなように、沈澱部分による藍色素の還元は起こらなかったが、沈澱部分と共に友種の上澄み液を添加すると藍色素の還元（藍醪が紺色から緑色になり肉眼でも判別可能）が起こることがわかった。しかし、加熱処理した沈澱部分に上澄み液を加えても藍の還元は起こらなかった。

沈澱部分を加熱処理すると藍還元力を失うことから、沈澱部分中には藍色素を還元する微生物の存在が示唆される。さらに、藍色素の還元には灰種の上澄み液中に含まれる物質が還元因子として作用している可能性も考えられる。藍還元菌ならびに還元因子については次報で報告する。

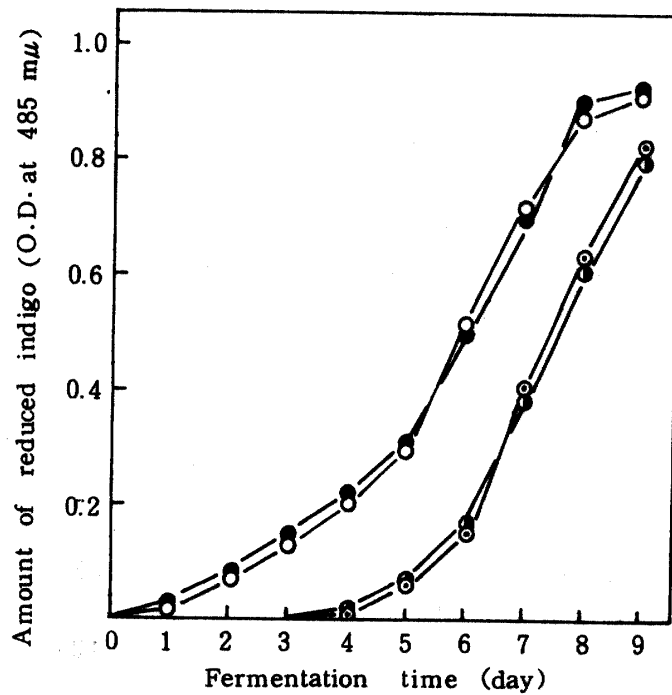


Fig. 5. Effect of supernatant and precipitate of the stock mash on the fermentation

Basal medium (500 ml) was contained 15% Ryukyuai, 0.2% soluble starch, and 0.1% polypeptone. Stock 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 basal medium. The precipitate was washed twice with 0.05%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  by centrifugation at 8000 rpm for 20 min and suspended in 0.05%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  to the same volume as the stock mash. The suspension was added to the basal medium. The other fermentation conditions and the analytical method were the same as described in the legends for Fig. 1. ○ : none, ○● : 0.5% supernatant, ○— : 0.5% precipitate, ● : 0.5% supernatant and 0.15% precipitate.



Table 1. Reduction of indigo by precipitate of the stock mash.

A reducing activity of precipitate and supernatant of the stock mash prepared as described in Fig. 5 was examined. A Thunberg tube was contained 2.0 ml of precipitate suspension, 2.0 ml of supernatant and 0.1 ml of 1.0 % indigo suspension treated with ultrasonic in the main room, and 2N NaOH (2.0 ml) in the second one. The pH of the reaction mixture was adjusted with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  or lactic acid to 10.5. After the air was substituted with  $\text{N}_2$  gas, the reaction was carried out for 60 hr at  $30^\circ\text{C}$ . The reaction was terminated by addition of 2N NaOH, and then the reduced indigo was solubilized into the solution by standing for 60 min at  $30^\circ\text{C}$ . The amount of reduced indigo in the supernatant of the reaction mixture was measured as described in the legends for Fig. 1

	Reduced indigo (OD at 485 nm)
(1) Precipitate	0.022
(2) Precipitate sterilized for 20 min at $120^\circ\text{C}$	0.020
(3) (1) + supernatant	0.126
(4) (2) + supernatant	0.030

#### IV 要 約

琉球藍の醗酵建において、醗酵を促進する物質について調べた結果、ブドウ糖、可溶性デンプン、泡盛、エチルアルコール、ポリペプトン、酵母エキスなどの添加が有効であった。また、水銀、銅、亜鉛、ニッケルなどの金属イオンは醗酵を阻害した。さらに、友種の沈澱部分が醗酵を促進することがわかった。友種の沈澱部分は、加熱処理すると藍色素の還元力を失った。

本研究に御便宜を計って下さった琉球大学教育学部美術工芸科安次富長昭教授、大城志津子助教授、ならびに泥藍を提供して下さいました伊野波盛正氏に感謝します。本研究の一部は昭和51年度沖縄県伝統工芸産業振興事業費補助金によったもので、謝意を表します。

## 参 考 文 献

1. 阿波藍に関する概説(1) 1974 徳島県工業試験所
2. 大城志津子 1972 藍の話, 琉球の文化, 2 : 43 ~ 47
3. 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
4. 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 第3報 炭素源と窒素源の補添効果, 醗酵工学雑誌, 38 : 218 ~ 221
5. ———, ——— 1960 細菌による藍の工業的還元に関する研究 第4報 窒素源について, 38 : 221 ~ 224
6. 富山弘基, 大野 力 1971 琉球の伝統染織, 53 ~ 62, 東京, 徳間書店

## Summary

On the vat fermentation with Ryukyuai, effects of the various substances were studied. The results obtained were as follows: glucose, soluble starch, Awamori, ethylalcohol, polypeptone, and yeast extract stimulated the fermentation rate. On the contrary, metal ions such as  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , and  $Ni^{2+}$  showed inhibitory to the fermentation. When a precipitate and a supernatant of the stock mash (starter) were examined for the effects on the fermentation, an increase in the fermentation rate was observed with the precipitate. The indigo reducing activity was diminished by the heat treatment of the precipitate.