

インジゴ還元酵素によるロイコ型インジゴ生成能および染色挙動の検討

田村 貞明*1

Study on Leuco Form Indigo Generation Ability and Dyeing Behavior by Indigo Reductase

Sadaaki Tamura

日本の伝統的な染色法である藍染めは、蓼（タデ）科植物の葉を原料として高温・好アルカリ性菌によるスクモの発酵生産工程と、好アルカリ性菌によるスクモの発酵還元（藍建てと呼ぶ。25℃, pH10-12, 約1ヶ月間）と織物の染色工程からなる特異環境微生物（酵素）を巧みに利用する重要な伝統産業である。本研究では、藍建て発酵に関与する好アルカリ性細菌の生産するインジゴ還元酵素によるロイコ型インジゴの生成能および藍染めにおける染色挙動について研究を行った。

1 はじめに

天然藍染め製品は、色相だけでなく防虫効果や保温効果にも優れ、高級織物として人気が高い。この産業は藍師と染色家による長年の経験と勘に基づく従来からの生物学的手法が主に用いられ、近年の分子レベルでの解析はほとんどなされていない。

本研究では、共同研究機関である九州大学農学研究大学院大島研究室において天然藍染め染色液より単離された好アルカリ性菌およびインジゴ還元酵素を用いて、簡便、多様、環境にやさしい新規な藍（インジゴ）染色法の実用化を図るため、微生物や酵素を利用する新染色法（酵素建て）の開発を主な目的とし研究を行った。

2 研究, 実験方法

2-1 装置・試薬など

吸光度は日本分光製、紫外可視分光光度計V-550、pHはメトラートレド社DELTA320型pHメーターおよび東亜ディーケーケー社製ポータブルイオン・pH計IM-22Pを用いて測定した。試薬はインジゴ（ALDRICH）インジゴカルミン（東京化成工業）、水酸化カルシウム、水酸化ナトリウム、ヒドロサルファイトナトリウム（和光純薬工業、以下ヒドロと略）を用い、スクモは徳島県の新居製藍所製を使用した。染色布は日本工業規格L0803に準拠した染色堅牢度試験用標準添付白布（綿および絹）を使用した。色の測定には日本電色工業社製分光式色彩計SE-2000を使用した。

2-2 ロイコ型インジゴ生成能について

インジゴおよびインジゴカルミン（図1）の紫外・可視（UV-VIS）吸収スペクトルの変化を経時的に追跡することによりロイコ型インジゴの生成能について検討した。インジゴおよびインジゴカルミンは溶液中で微生物（インジゴ還元菌）による還元を受け、図2に示すように構造が変換される（ロイコ型インジゴ）。インジゴの場合、酸化型、還元型いずれも水に溶けにくいという性質を持つが、還元型であるロイコ型インジゴの水酸基がアルカリ溶液中でナトリウム塩となりイオン化することによって水溶性となり、繊維へ染着できると考えられる。

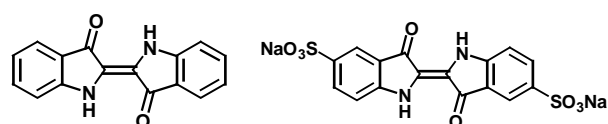


図1 インジゴ（左）およびインジゴカルミン（右）の構造式

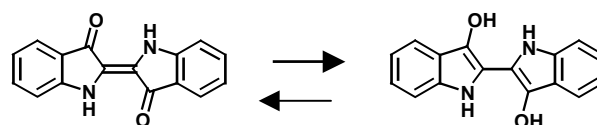


図2 インジゴの還元（右矢印）およびロイコ型インジゴの構造式（右化合物）

まず、インジゴの吸収スペクトルを確認したのち、化学的還元剤であるヒドロを用いて還元を行った。ヒドロによるスペクトル変化を確認した後、還元菌によるインジゴの還元を行い、スペクトルの比較を行っ

*1 化学繊維研究所

た。次にインジゴカルミンを用いて同様の実験を行った。

2-3 天然藍建て法による染色挙動の検討について

試験管レベルでインジゴカルミンに対するインジゴ還元菌のロイコ型インジゴ生成能を確認した後、スクモを用いた天然藍建てに対するインジゴ還元菌の作用および染色挙動について検討した。実際の伝統的な藍染色場では、180Lから360L（一石から二石）と容量の大きな甕やコンクリート製の染色槽を用いて染色が行われており、小容量での藍建てでは液面が空気に接する割合が大きくなることから、pHの維持など管理が難しく、一定の藍建てを行うことができないと言われている。今回は実験室スケールで安定して藍建てが行える最低限の容量であると考えられる15Lの容器で天然藍建てを行い、そこにインジゴ還元菌を添加して、藍建てに要する時間や、染色結果について検討を行った。

天然藍染め実験の概要は15Lのポリプロピレン製容器に、徳島産スクモ1.0kg、水酸化カルシウム30g、水酸化ナトリウム15g、グルコース18g、および水7Lを加え、pHが十分に下がり還元が始まると、更に水と水酸化カルシウムを加える。実験は常時22℃に保たれた実験室で行い、還元の進行具合はpHの変化、外観変化、および簡易的にキムワイプなどの紙を染色し色の変化を観察することにより確認した。

染色テストは染色液の状態が一定になったところで、綿および絹について5分浸漬5分空気酸化を繰り返し10回まで行い、各染色後に十分水洗した。染色布は分光式色彩計にて色の測定を行い、CIE（国際照明委員会）Lab表色系の明度L*の値で評価した。

3 結果

3-1 ロイコ型インジゴ生成能について

3-1-1 インジゴの場合

ハイドロによるインジゴ還元の結果、ハイドロ添加により、690nmの吸収極大が減少することが確認できた（図は省略）。次にインジゴ還元菌の培養液にインジゴを加え吸光度の変化を追跡したが、培養液自体の濁度の大きいことやインジゴが水にほとんど溶解しないため、吸光度の減少を確認することが出来なかった。水溶性の化合物であるインジゴカルミンを用いて実験を行った。

3-1-2 インジゴカルミンの場合

インジゴカルミンは610nmに吸収極大を示し、ハイドロの添加によって即座にその吸収が消失した（図3）。そこでインジゴ還元菌培養液にインジゴカルミンを加えた場合の610nmでの吸光度の変化を120分後まで観測した結果、反応開始後30分後までは吸光度に変化はないがその後徐々に減少し、インジゴ還元菌によってインジゴカルミンが還元されていることが確認できた（図4）。また、吸収スペクトルは分光光度計のセル中で実験をおこなったが、還元の様子を目視するために試験管での還元実験を行った。その結果、インジゴカルミンを添加後1日静置すると、空気に接していない溶液下部においてはインジゴカルミンが還元され溶液が黄色になっていることが確認できた。溶液の上部は空気に接しているため還元されてもすぐに酸化されて青色に戻っていると考えられる。さらに1日静置後、試験管を軽く振盪すると溶液中に空気（酸素）が入りロイコ型インジゴカルミンは酸化されて、もとのインジゴカルミンの青色に戻ることも確認できた。

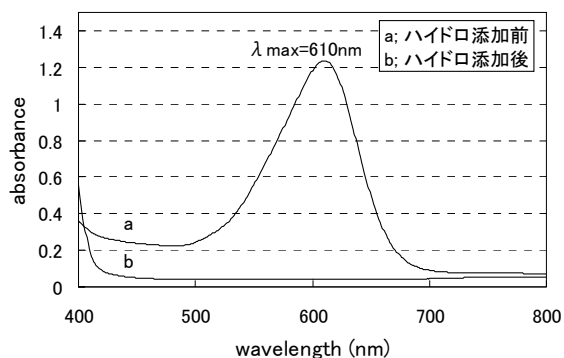


図3 インジゴカルミンにハイドロを加えた場合の吸光スペクトルの変化

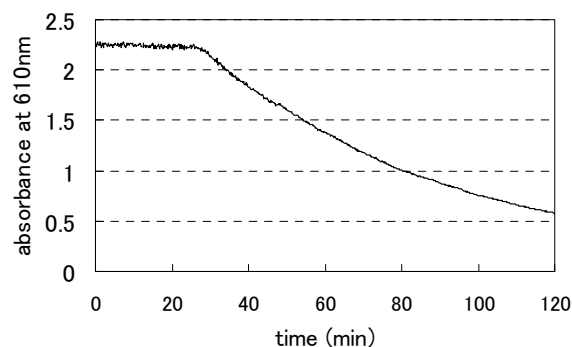


図4 インジゴ還元菌培養液にインジゴカルミンを加えた場合の吸光度の経時変化

3-2 天然藍建て法による染色挙動の検討

3-2-1 藍建てに要する時間の短縮化について

天然藍建てにおけるpHの変化を図5に示す。仕込み時のpHは約12.2であり、その後徐々に減少して14日目にpH=10.26となる。この時点で染色液中のインジゴは十分に還元されているが、この状態ではスクモの割合が多く不溶物がかなりあるために染色ができない。そこでアルカリと水を更に添加し（これを伝統的藍建て法では中石、口上と呼ぶ）、再びpHが減少するのを待つ。更にpHが下がったところで、石灰をさらに加える工程（止石）を行って、pHが下がったところで染色を行うのが従来の方法である。

今回はインジゴ還元菌の添加による染色液の状態変化を見るため、中石までにかかる時間について検討を行った。仕込み後2日目および、4日目にインジゴ還元菌を各100ml加え、コントロールとして菌の培地のみ加えたものについて比較を行った。その結果をpHの変化について図6に示す。pHについては、菌添加の場合、コントロールの場合いずれもほぼ同じように減少しており大きな違いは見られなかった。しかしながら外観変化では菌添加したものは12日目に染色液を攪拌することにより、藍建てが進んでいることを示す泡（藍華）の発生がみられた（図7）。また簡易染色テストでは、菌添加したものが、12日目で青く染められるようになり、コントロールでは13日目となり、約1日早く藍建てが可能となった。

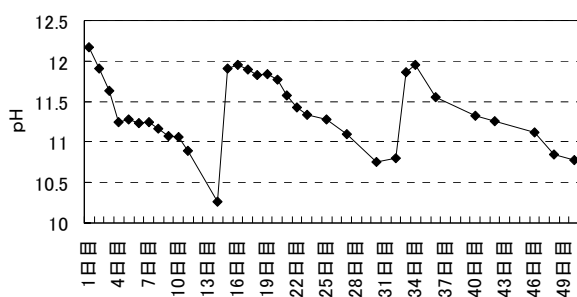


図5 伝統的藍建てにおけるpH変化

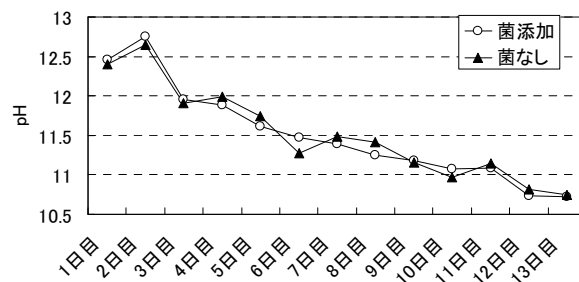


図6 インジゴ還元菌添加の場合のpH変化



図7 12日目の染色液（菌添加）の様子

3-2-2 染色テストについて

染色テストは中石後、pHが十分に下がり染色液の還元状態が一定の状態となった33日目に綿布、35日目に絹布について実験を行った。染色時の染色液のpHはインジゴ還元菌添加の場合がpH=10.56、菌添加なし（コントロール）がpH=10.38であった。絹の染色試験は綿布の染色後、染色液を1日休ませてから行い、pHは菌添加、菌なしの場合でそれぞれpH=10.41、pH=9.99であった。pHは多少異なっているが、紙による簡易染色テストで同じように濃色に染まることを確認している。綿布の染色結果を図8に、絹布の染色結果を図9に示す。L*の値が小さいほど、濃色に染まっていることを示しており、綿、絹いずれの場合においても、染色回数が多いほど濃色に染色されている。また、インジゴ還元菌を添加していないコントロールに対して、インジゴ還元菌の培養液を添加したものの方が濃色に染色できる傾向が見られる。綿布の場合、染色回数が少ないと色むらができるが、回数を重ねるごとにほぼ均一に染色できた。

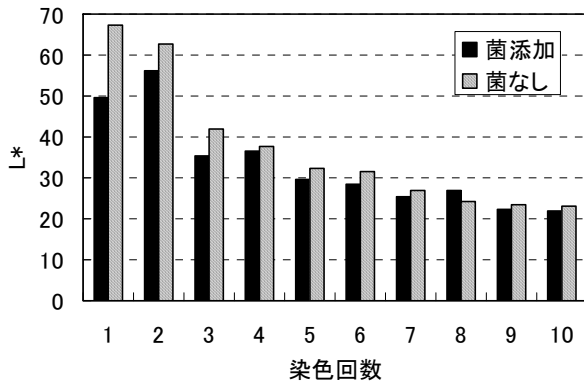


図8 綿の染色テスト結果

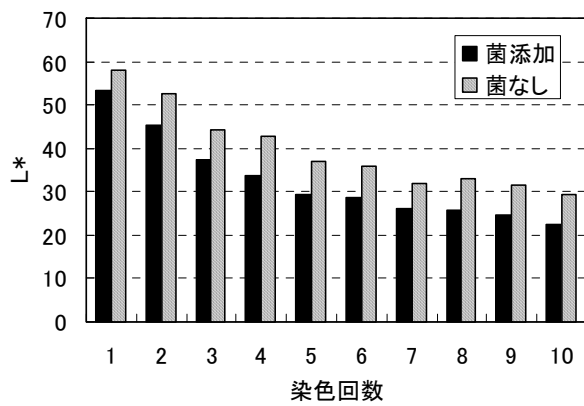


図9 絹の染色テスト結果

4 まとめ

天然藍染め染色液から単離・同定されたインジゴ還元菌を培養し、染色液に添加することにより、藍建てに必要な日数を一日短縮でき、染色について濃色に染色できることが明らかとなった。今後は、インジゴ還元菌を添加する方法、添加量およびタイミングをさらに検討し、最適な条件を見出す必要がある。

5 謝辞

本研究は財団法人福岡県産業・科学技術振興財団、IST研究FS事業『「藍建て」醗酵工程の分子生物学的解析と新規藍染色法の開発』の分担試験項目として研究を行った。