

微生物変換によるインジゴの生産

— 菌株の分離と諸性質 —

高橋 巧 佑*・上松 仁

Production of Indigo by Bioconversion — Isolation of a producer and its properties —

Kousuke TAKAHASHI* and Hitosi AGEMATU

(平成20年11月28日受理)

For indole transformation to indigo, we isolated *Acinetobacter calcoaceticus* BT8 from a Kurokawa oil field, Akita prefecture, with an enrichment culture. *A. calcoaceticus* BT8 grew well on an agar plate containing 300 μ g/ml of indole and produced indigo around their colonies. This indicates that indole is oxidized to 3-hydroxyindole by monooxygenase in the cells, and then that 3-hydroxyindole is chemically oxidized to form indigo by oxygen outside the cells. The monooxygenase was considered to be induced by indole to metabolize it. Therefore, indole was added to a medium when its carbon source was consumed completely to induce the enzyme efficiently. In the optimized conditions, the yield and the formation rate of indigo were estimated to be 21% and 7.1 mg/Lh, respectively.

1. 緒言

青色染料のインジゴ（藍）は、最も古い天然染料の一つである。少なくともBC2000年のミイラを包んでいた麻布が藍で染められていたことが知られている。1800年代の終わり頃まで、インジゴはアフリカやアジア、南アメリカに広く分布するコマツナギ属 (*Indigofera*) という植物から得られていた。日本では、絹を使うことを禁止され綿が庶民の衣服として好まれた江戸時代にタデ科の蓼藍（タデアイ）が栽培され、藍染として盛んにインジゴによる染色が行われた。その後、Alfred von Baeyerがインジゴの構造を決定し1887年に初めてインジゴの合成が行われ、1897年にBASFにより工業的合成法が開発された。1913年までには天然インジゴはほぼ合成インジゴに取って替わられた。2002年の全世界におけるインジゴの生産量は1万7千トンである。

インジゴによる染色を理解するには、藍染の原理（図1）を知る必要がある¹⁾。インジゴは2分子のインドールが2位で二重結合した構造である。まず、

藍を含んだ植物（タデアイの葉）を採取する。インドールは植物中では3位にグルコースが結合したインジカンとして存在している。この葉をつぶすと葉の中に存在する加水分解酵素によりグルコースが外れてインドキシル（3-hydroxyindole）が生じる。また、「すくも」を作る場合は、100日間発酵させる。この間にインジカンは微生物などの加水分解酵素によりインドキシルに変わる。インドキシルは空気により酸化されてラジカルになり、2分子が重合して

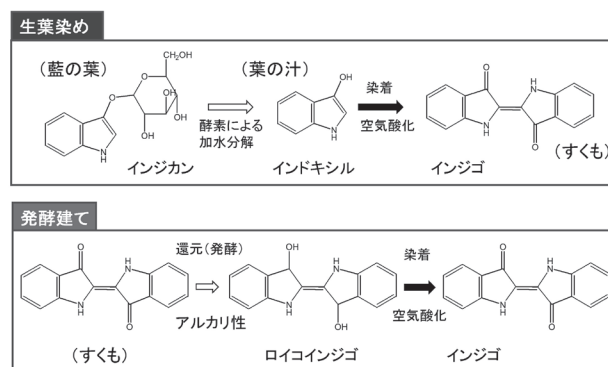


図1 藍染め過程での化学変化

* 秋田高専専攻科学生

水に不溶なインジゴが生成する。こうしてできた堆肥状の塊を「すくも」と言う。次に、藍染の方法について述べる。インジゴは水に不溶な為、染色するためには可溶化しなければいけない。「すくも」を大きなかめの中で灰汁（あく）とふすま、お粥、糖分などとともに混ぜて放置し、発酵させて還元し、藍のロイコ体であるロイコインジゴ（白藍）に変えて水に溶けるようにする。そして、この中に繊維を漬け込み、ロイコインジゴを吸着させた後に引き上げて、空気にさらして酸化させインジゴに戻して藍の染色を行う。このインジゴをロイコインジゴにする過程を「建てる」と言い、微生物により還元する場合を「発酵建て」、ハイドロサルファイトなどの還元剤を使う場合を「化学建て」と言う。工芸品としての藍染は「すくも」を用いた「発酵建て」で染色を行うが、工業的には合成インジゴを用いて「化学建て」でデニムなどの染色を行う。

染料で繊維を染色する為には、それに先立つ染色という過程が必要になる。染色とは染料分子の繊維への吸着で、絹や毛などのタンパク質繊維への吸着ではイオン結合、疎水性相互作用などが、綿などのセルロース繊維への吸着では水素結合が主な結合になる。藍染めでは2つの染色法を行うことができる。一つはインドキシルを繊維に吸着させ空気酸化してインジゴにして染色する方法。もう一つはロイコインジゴを繊維に吸着させて空気酸化してインジゴに戻して染色する方法である。前者は一般に「藍の生葉染め」と言われ、アルカリ性にする必要がないのでアルカリに弱い絹の染色に適している。しかし、インドキシルは酸化されやすく不安定で扱いにくいので藍染めでは後者の方法が用いられている。

現在、工業的なインジゴの製造法としては、アニリンとクロロ酢酸、あるいはアニリンと青酸（シアン化水素）およびホルムアルデヒドを原料としてN-フェニルグリシン塩を製造し、これを高温でアルカリ溶解してインドキシル化合物とした後、更にこれを空気酸化する方法が採られている（ホイマン・プレガー法）。しかしながらこれらの方法は、有害な化学薬剤を原料とする、反応工程が多段階できわめて複雑である、毒性の高い副生物が生成する、多量の水酸化カリウムと水酸化ナトリウムを使用しなければならずこれらの回収再利用に際して多大のエネルギーを消費する、またそのための特殊な装置が必要である、等の問題点を抱えている。

そこで、本研究では化学品の原料として広く流通しているインドールを原料として微生物変換によりインジゴを環境負荷をかけずに経済的に生産するこ

とを目指し、インドールの3位を水酸化してインドキシルを生成する菌の探索を様々な環境の土壌から行った。

2. 実験方法

2.1 培地組成及び培養条件

本研究で使用した分離培地の組成は、酵母エキス 0.1%、ポリペプトン 0.1%、 KH_2PO_4 0.1%、(pH 6.8)である。なお、寒天平板分離培地は1.5%の寒天を加えた。培養温度は通常30℃で、試験管培養のときはレシプロシェーカで、フラスコ培養のときはロータリーシェーカで振とう培養した。

2.2 フェノール、インドール資化性菌の集積培養

畑、公園、山林、油田などから土壌を採取し、耳かき一杯程の土壌をフェノールもしくはインドールを最終濃度100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した分離培地2mlを入れた試験管に入れて、30℃で一晩、振とう培養を行った。菌の生育による濁りが見られた培養液200 μl を新たに先と同じ組成の分離培地に植菌して、30℃でさらに一晩、振とう培養を行った。この2回の集積培養で生育してくる菌は、フェノールもしくはインドール資化菌、あるいは耐性菌のどちらかであると予想した。

2.3 インジゴ生産菌の分離

2回目の集積培養液からインジゴ生産菌を分離するために、培養液を生理食塩水で適当に希釈して、100 $\mu\text{g}/\text{l}$ のインドールを添加した寒天平板分離培地に塗布して、30℃で一晩培養した。インジゴ生産菌はコロニーの周辺がインジゴの生成により青くなるので、非生産菌との区別が容易であった。

2.4 インジゴの定量

液体培養により生成したインジゴは遠心分離で回収し、培養液と等量のN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に溶かして、分光光度計で600nmの吸光度(A600)を測定した。 $\epsilon = 15,900 / \text{M cm}$ からインジゴ濃度を求めた²⁾。但し、相対的なインジゴの生産量を比較するときはA600を用いた。

2.5 HPLC分析

インジゴのHPLC分析は以下の条件で行った。
カラム：ZORBAX SB-Aq (4.6I.D.×150mm)
移動相：70% MeOH (v/v)
流速：0.5 ml/min

カラム温度：40℃

検出：UV 280nm（インジゴのみ分析するときは600nm）

この分析条件で、インジゴ、インジルビンの保持時間はそれぞれ、9.18分、23.7分であった。

インドールのHPLCによる定量は以下の条件で行った。

カラム：YMC JH-307 (4.6I.D.×75mm)

移動相：60% MeOH (v/v)

流速：1.0ml/min

カラム温度：40℃

検出：UV 280nm

この条件でインドールの保持時間は2.1分であった。

2.6 インジゴ生産菌の同定

10F:5'-GTTTGATCCTGGCTCA,
800R:5'-TACCAGGGTATCTAATCCの2つのプライマーを用いて、生産菌のゲノムの16SrDNA領域をPCR法により増幅し、得られたDNA断片(753bp)をシークエンス後、National Center for Biotechnology information (NCBI)³⁾のBLASTサーチでホモロジー検索を行った。

2.7 NTG変異処理

インジゴ生産菌のインドール耐性を上げるために*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン(NTG)による変異処理を行った。菌株を2mlの分離培地に植菌して30℃で一晩振とう培養した。この培養液から7500rpm、8分の遠心分離により菌体を回収し、0.1Mクエン酸緩衝液(pH 5.5)で2回洗浄後、菌体に0.4mlのNTG液(250μg/ml)と0.6mlの0.1Mクエン酸緩衝液(pH 5.5)を加えて30℃で30分間振とうした後、遠心分離により菌体を回収し、生理食塩水2mlで3回洗浄を行った後、回収した菌体に分離培地1mlを加え、この菌液20μlを2mlの分離培地に植菌して30℃で一晩振とう培養した。培養液を適当に希釈して目的の濃度のインドールを添加した寒天平板培地に塗布してインドール耐性菌の分離を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 インジゴ生産菌の分離

一般的な土壌から集積培養により35株(BK1~35)のインジゴ生産菌を分離した。しかし、これらの菌株はインドール濃度100~200μg/mlが成育限界であったので蓄積するインジゴの量が不十分であっ

た。

そこで、芳香族化合物に対する耐性が高い菌が成育していると期待できる油田の土壌からの菌の分離を試みた。秋田市の黒川油田の汲み上げポンプ周辺(図2)の原油が染み込んだ土壌を採取し、集積培養によりインジゴ生産菌5株(BT6~10)を分離した。また、草生津川周辺から採取した土壌サンプル



図2 黒川油田の汲み上げポンプ

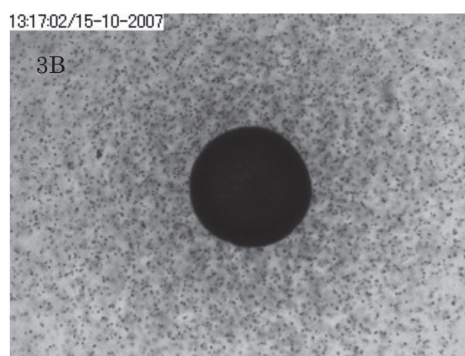
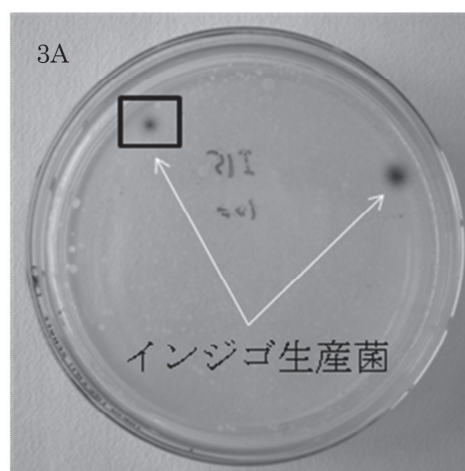


図3 インジゴ生産菌のコロニー

からも5株 (BT1~5) のインジゴ生産菌を分離した。草生津川からの分離株はインドール耐性が150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、黒川油田から分離した株は300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。BT8株はインドール濃度300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の寒天平板でコロニーを作ると、コロニーの周りがインジゴの生成により青くなり (図3A)、これを顕微鏡で見るとコロニーの周りにインジゴの結晶が生成しているのが観察された (図3B)。このことからインドールは菌体内に取り込まれモノオキシゲナーゼにより酸化されてインジカンになり、一部が菌体外に排出されて水溶液中の酸素により化学的に酸化されてインジゴになり結晶化したものと考えた。

3.2 インジゴ生産菌の遺伝的安定性

インジゴ生産菌を継代培養をしていくと生産能が脱落していくことが一般に見られることから、インジゴ生産菌の遺伝的安定性を調べた。インジゴ生産菌をインドール濃度300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の液体培地で30 $^{\circ}\text{C}$ で一晩振とう培養してインジゴの生産を確認後、インドール濃度300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の寒天平板に塗布してインジゴを生産しない白色コロニーが生じるか見た。その結果、BT8株においては白色コロニーの出現が全く見られず遺伝的安定性が高いことが分かり、以後の実験に用いることにした。

3.3 BT8株の菌株同定

シーケンスした配列をNCBIのBLAST検索にかけたところ、登録されている *Acinetobacter calcoaceticus* 16S ribosomal RNA (登録番号: EF432578) の22番目から774番目までの塩基配列と完全に一致したことから、BT8株を *Acinetobacter calcoaceticus* BT8と命名した。*Acinetobacter*はグラム陰性の桿菌で運動性を有さず、広く環境中に存在する細菌である。

3.4 インジゴ変換の培地検討

菌濃度が高いほどインジゴ生産量が高いと考え、分離培地の濃度を2, 3, 4倍と上げた高濃度培地と大腸菌の培養で使われているLB培地 (トリプトン1.0%, 酵母エキス0.5%, 塩化ナトリウム1.0%, グルコース0.1%, pH 7.2) を用いてインジゴの生産実験を行った。24時間培養で通常分離培地では濁度 (A680) が0.95であったのに対して、4倍濃度の培地では1.71、LB培地では2.57と菌体濃度が増加した。しかし、インジゴの生産量 (A600) はインドール400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加でそれぞれ、3.32, 0.54, 0.41と培地濃度の低い分離培地での生産量が最も高かった。この結果から、インドールを酸化する酵素は、培地

由来の炭素源が無くなってからインドールを資化するために誘導される誘導酵素であると考えた。したがって、栄養源が豊富な培地ほどインドールを資化する必要がないのでインドール酸化酵素は誘導されないことになる。

3.5 BT8株のNTG変異処理

インジゴの生産量は培地に添加するインドール濃度に比例している。BT8株のインドール耐性を上げることによりインジゴ生産能力の向上を図った。BT8株のインドール耐性は400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までであった。そこで、NTGによりBT8株に突然変異を起こさせ、その中からより高濃度のインドールを添加した寒天平板で生育できる菌のスクリーニングを行った。その結果、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも生育できる菌を分離することが出来、BT8-1A株と名付けた。

3.6 インドールの添加時期の検討

BT8-1A株を分離培地に植菌して、培養の初めからインドールを添加すると300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が限界だった。それ以上の濃度では生育しなかった。そこで、30 $^{\circ}\text{C}$ で培養開始後に時間をおいて400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のインドールを添加してインジゴへの変換実験を行った。

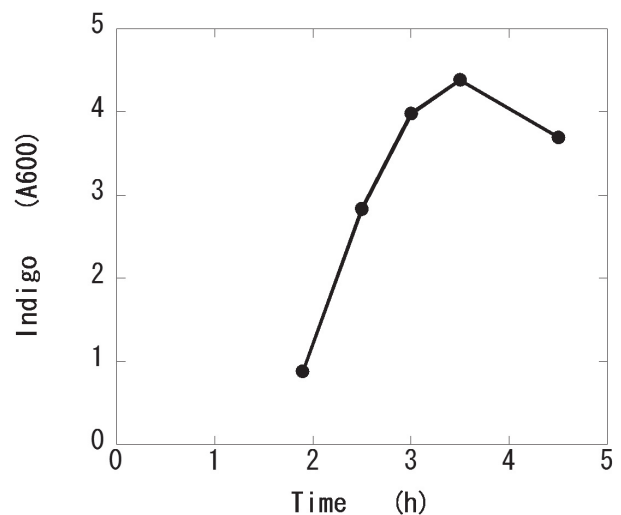


図4 インドール添加時期の検討

図4の結果より、培養開始3~4時間でのインドールの添加が最も生産量が高いことが分かる。この時期は菌の対数増殖期の初めに当たると考えられ、最もタンパク質の生合成が盛んな時期である。誘導酵素であるインドール酸化酵素を多量に誘導するためにはこの時期にインドールで誘導をかける必要があると判断した。この時期を逃して4時間以降に添加

した場合にはすでにタンパク質の合成時期を過ぎて
いるので誘導酵素が余り作られなくなる。図5に培
養開始後、0, 3, 5, 7, 9時間後のインドール添加
のフラスコ培養試験の結果を示す。0時間の添加で
は菌の生育は見られず、5時間後の添加が最もイン
ジゴの蓄積量が多かった。9時間後では菌は生育し
ているが変換は全く見られなかった。

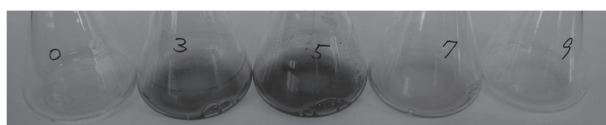


図5 フラスコ培養によるインドールの添加時期

3.7 BT8-1A株の培養の経時変化

先にインドールの最適な添加時間が分かったが、
最適培養時間は培養温度、培養条件により変わる
ので、菌体濃度 (A680) と関連付けることにした。
そこで、BT8-1A株の分離培地、30℃、フラスコ培
養 (20ml/100ml-F) における pH と菌体濃度の経時
変化を測定した。結果を図6に示す。

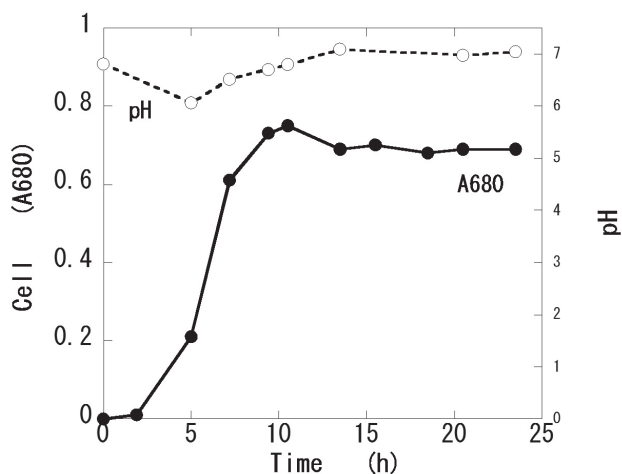


図6 BT8-1A株の培養の経時変化

培養開始とともにpHが下がっていく。これは培
地成分中の炭素源を異化代謝して有機酸が生成した
為である。そして培養5時間からpHが上昇してい
る。これは炭素源を全て消費して次にアミノ酸を異
化代謝する際にアンモニアが生成したからである。
培養10時間で全ての栄養源を消費尽くして定常期に
入る。この結果よりインドールを添加するタイミン
グはpHが上昇し始める培養5時間後になる。この

時、炭素源が無くなっているためインドールを添加
すると効果的にインドール水酸化酵素を誘導するこ
とができる。芳香族化合物の資化は水酸化から始ま
る。この時の濁度 (A680) は0.21であるので、イン
ドールの添加時期は、以後の実験では濁度が0.2~0.3
になったときとした。

3.8 添加するインドール量の限界と変換率

インドール添加の最適なタイミングが分かった
ので、BT8-1A株が果たしてどのくらいのインドール
濃度まで変換できるのか実験した。分離培地、
28℃、フラスコ培養 (10ml/100ml-F)、濁度 (A680)
が0.36になったとき、最終濃度で100, 200, 300,
400, 500 μ g/mlのインドールのDMSO溶液を添加
した。培養を22時間まで行い生成したインドールを
定量した。図7に示すように500 μ g/ml添加では菌
が生育せず変換は起きなかった。BT8-1A株のイン
ジゴ変換の限界濃度は400 μ g/mlであった。インジ
ゴの生産量はインドール濃度が高くなるにつれて増
加した。図8に示すように、インドールからインジ
ゴへの変換率は、添加量が増えるにつれ増加し、
400 μ g/ml添加で収率が最も良く21%であった。収
率が低いのは菌がインドールを資化しているためと
考えた。

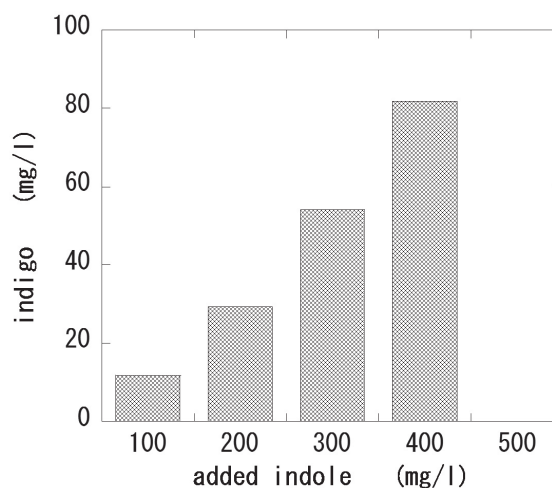


図7 添加インドール量と生成したインジゴ濃度

3.9 インドールの消費速度の測定

水に不溶なインジゴを経時的に正確に定量する
のは難しいので、インドールの消費速度からイン
ジゴの生成速度を予想した。30℃、フラスコ培養
(100ml/500ml-F)、濁度0.34 (培養4時間後) で300
 μ g/mlのインドールを添加した。その後、経時的に

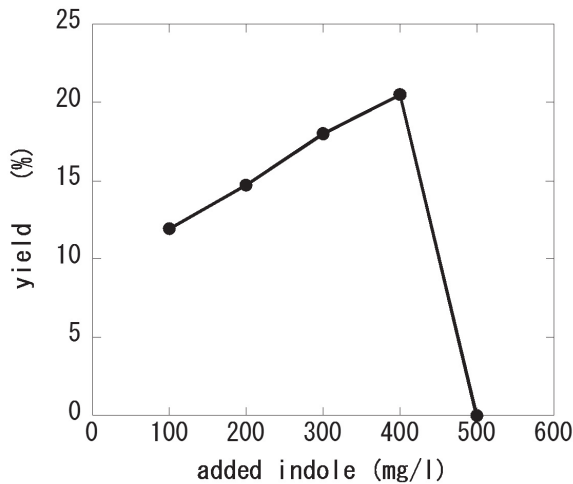


図8 各添加量における変換率

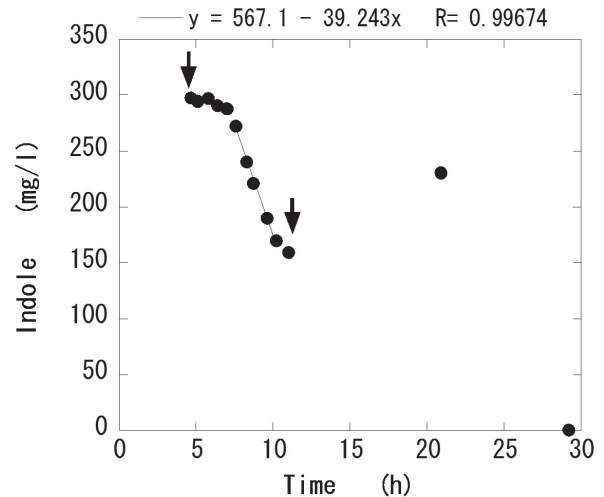


図9 インドール消費速度の測定

サンプリングして培養液中のインドール濃度を定量した。結果を図9に示す。矢印が300 μ g/mlのインドールを添加した時期である。2回添加した。1回目添加の減少の直線部分から傾きを求めるとインドールの消費速度は39.2 mg/Lhであった。先の300 μ g/ml添加の収率18%から計算するとインジゴの生成速度は7.1 mg/Lhと予想される。また、培養30時間まで変換活性が持続することが分かった。

3.10 微生物を用いた絹の藍染

本研究の目的は藍染めに用いることができるインジゴを製造することにある。最終的に生成したインジゴは遠心分離により回収してアルカリ条件下、ハイドロサルファイトで還元してロイコインジゴにして木綿を染着、染色することができる。

一方、もう一つの染色法であるインドキシルによる絹の染色を試みた。双極分子であるインドキシルは絹などのタンパク質に吸着するが、セルロースには吸着しない。建て染めはアルカリ条件下で行うためタンパク質である絹を痛めることになる。中性で絹を簡単に藍染めできる方法が求められている。

37 $^{\circ}$ C、フラスコ培養 (100ml/500ml-F)、濁度0.34 (培養2.5時間後) で300 μ g/mlのインドールを添加した。同時に煮沸処理をした2個の繭 (蛹は取り除いている) をフラスコに入れて振とうした。1.5時間で繭を鮮やかな藍色に染色することができた。

4. 結論

黒川油田の原油が染み込んだ土壌からインドール資化性を指標にした集積培養により *Acinetobacter*

calcoaceticus BT8株を分離した。BT8株はインドール濃度300 μ g/lの寒天平板上で生育することができ、通常の畑などから分離した菌よりもインドール耐性が高かった。インドールをインジゴへ変換するインドール3位水酸化酵素はインドールの資化に関わる誘導酵素であると予想され、培地の炭素源が枯渇する次期 (濁度A680=0.2~0.3) が最適なインドールの添加時期であった。誘導された水酸化酵素は30 $^{\circ}$ C培養では培養30時間まで活性が持続した。この時のインジゴ最高生成速度を7.1mg/Lhと予想した。変換率は400 μ g/lインドール添加で21%であった。他のインドールは菌により資化されたと考える。

今後の予定は、BT8-1A株で変換できるインドール濃度の限界が400 μ g/mlなので、更にインドール耐性を上げることによりインジゴの蓄積濃度を上げていく。さらに、染色したい場所に不安定なインドキシルを微生物により生成することができるので、この微生物変換の特性を活かした藍染めの開発を行っていきたい。

参考文献

- 1) 青柳太陽：「工芸のための染料の科学」, 理工学社, pp.24-34 (1994)
- 2) A. Meyer, M. Wursten, A. Schmid, H-P E. Kohler, and B. Witholt: "Hydroxylation of Indole by Laboratory-evolved 2-Hydroxybiphenyl 3-Monooxygenase", *J. Biological Chemistry*, 277, 34161-34167 (2002)
- 3) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>