



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis of the changes in microbiota associated with indigo reduction in natural indigo fermentation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Tu, Zhihao
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13932号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77983
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tu_zhihao_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏 名 Tu Zhihao

審査担当者	主査	客員教授	湯本	勲
	副査	教授	横田	篤
	副査	客員准教授	菊池	義智
	副査	客員准教授	加藤	創一郎

学位論文題名

Analysis of the changes in microbiota associated with indigo reduction in natural indigo fermentation

（藍染め発酵液のインジゴ還元に関連する微生物叢の変遷の解析）

本論文は英文 108 頁、図 16、表 3、6 章からなり、参考論文 2 編が付されている。

一般的な藍色染色は、近年の科学技術の発達に伴い、コストや生産性の面で有利である一方、環境に多大な負荷のかかる方法が採られている。本研究は植物が生産した色素を先人が経験によって生み出したプロセスの機構を解明し、より確実に効果的な方法により資源循環型社会に資することを目的としている。ポイントとなる点は①自然発酵にも関わらず、目的となる色素の還元が比較的短期間で起こるメカニズム②発酵過程の途中で強制的な酸素や雑菌の導入に晒され、通常の発酵環境では考えられない様な細菌叢の維持に厳しい条件下でインジゴの還元状態を維持し続ける理由や③最終的にはインジゴ還元にとって有害な微生物によりインジゴの還元が維持し続けられなくなる状態に至るまでを解析し、その結果をまとめたものである。

1) 自然発酵によるインジゴの発酵液のインジゴ還元が発生に伴う微生物叢の変化の解析

藍染めの発酵液の様な長丁場の発酵液を長時間維持させるためには、最初の仕込みの工程を適正に行うことが重要であると考えられること、自然発酵において目的とする色素の還元に至る工程に伴う微生物叢の変化を知るとは非常に興味深いものと考えられることから、本項目では発酵初期の微生物叢に特に焦点を当てて解析している。従来の藍染の発酵液の伝統的な調整法では、純粋な種菌を接種しているわけではなく、原料であるスクモに付着していた微生物の中から必要な微生物が選抜されてくることが予想される。*Alkalibacterium*, *Amphibacillus* や *Polygonibacillus* 等のインジゴ還元の原因となる微生物が発酵の主原料であるスクモに含まれていることを確認している。藍の還元が起こるまでに熱に対する耐性が強い孢子形成能がありかつ好気代謝能を併せ持つ *Bacillaceae* が優勢となる変化が仕込みから 2 日目までに起こり、仕込み 5 日目から 7 日目までに絶対嫌気微生物 *Anaerobranca* が優勢となる 2 回の大きな変化があることを明らかにしている。

この前半に *Alkalibacterium* が増加し、後半に *Amphibacillus* が増加しており、仕込み時の熱処理により *Bacillaceae* がセレクトされ、当該微生物群が発酵系内の酸素を消費し、酸化還元電位の低下をもたらし、インジゴ還元菌のインジゴ還元能を促すとともに絶対嫌気性微生物が卓越する環境を生み出したものと推察される。このことにより、仕込みの際の前処理とその際セレクトされた微生物の代謝能によってインジゴ還元に至ることが示されている。

2) 異なるインジゴ還元状態維持期間の発酵液の比較

藍の発酵液は嫌気環境とインジゴの還元状態を維持し続けなければならないが、実際は外部からの酸素や雑菌の混入が頻繁に起こる条件下で平均して約 6 か月長ければ 1 年以上インジゴの還元環境を維持し続けるが、還元状態の維持機構は未解明である。そこで本論文では、長期間維持し続けた発酵液と短期間しか維持出来なかった発酵液の微生物叢の変化を解析している。微生物叢の変化について主成分解析を行ったところ、短期間しかインジゴの還元状態を維持出来なかった微生物叢は発酵開始から 35 日まで比較的速い速度で変化したのに対し、長期間維持し続けた発酵液は仕込みから 10 日目以降ゆっくりとした速度で変化した。この結果により発酵液が長期間還元状態を維持するためには、10 日目前後に *Anaerobacca* 等の絶対嫌気微生物が優勢な微生物叢が形成されその後安定期に入ることが重要であることを示唆する結果を得ている。

3) 3 つの異なる運用方法による発酵液の比較

3 つの運用方法の異なる発酵液について、同じ解析方法で藍の発酵液の微生物叢の変遷における共通する事象を見出すための解析を行った。インジゴの還元が起こる際に、*Oceanobacillus* 属等のインジゴ還元能を有する微生物の存在下で、*Bacillaceae* と *Anaerobacca* の様な絶対嫌気性微生物の存在比の逆転が起こっていること、インジゴ還元の安定期には複数のインジゴ還元菌が発酵時間の経過とともに変化して存在することによって比較的高い割合で存在し、発酵液が安定な要因は、高 pH、低い酸化還元電位、インジゴ還元能を持つ微生物の現場のニッチに占める割合が規定していることが示唆する結果を示している。また、発酵液のインジゴ還元能の消失には発酵液中の微生物叢の多様性が増す中、インジゴ還元と中性細菌 *Parapusillimonas granui* の存在比が逆転することによって起こることが示された。

以上、本研究では藍の発酵液の微生物叢の変化を解析することにより、発酵の初期にインジゴの還元が起こり、インジゴの還元状態が安定期に入り、最終的に発酵液がインジゴ還元能を消失するまでの変化を明らかにしている。以上の成果は、より確実に安定な藍の発酵液の仕込みやメンテナンス法に貢献する以外に、自然発酵を用いた他の発酵系や微生物の還元能を利用した系の理解や改善に寄与するものである。

よって審査員一同は Tu Zhihao 氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。