

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：54601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K04830

研究課題名（和文）微生物を含むリキッドマーブルを気相中マイクロリアクターとする生体ファイバーの合成

研究課題名（英文）Production of biofibers in liquid marbles containing microorganisms as gas-phase microreactors

研究代表者

直江 一光 (Naoe, Kazumitsu)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・教授

研究者番号：00259912

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、気相中で固体粒子によって安定化された液滴（リキッドマーブル）を安全な微粒子で調製し、その中で微生物を培養することにより、新規のバクテリアファイバー生産システムの構築を目指した。安全なステアリン酸塩リキッドマーブル集合体を微生物培養場として利用することにより、安全で、大量かつ、高速でバクテリアファイバーの生産が可能であることを示した。また、生産されたファイバーが、従来のものと比べ、ミクロ構造が異なり、保水性が高いことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物培養によるバクテリアナノセルロースの生産は、植物由来のセルロースとは異なり、高温高压処理や危険な化学薬品処理を必要としないため、安全に高純度のナノセルロースを得ることができる。本研究成果は、安全なリキッドマーブル集合体を微生物培養場として利用することにより、安全で、大量かつ、高速でバクテリアナノセルロースの生産が可能となることを示しており、本技術の実用化が進めば、低環境負荷グリーンナノ材料の一層の普及につながる。

研究成果の概要（英文）：The novel production system of biofibers was developed using liquid marbles containing microorganisms. It was demonstrated that safe, large-scale, and high-speed production of bacterial cellulose fibers is possible by using liquid marbles of stearate microparticles as microbial culture media. In addition, it was shown that the produced fiber has a different microstructure and higher water holding than the conventional one.

研究分野：生物化学工学

キーワード：リキッドマーブル バクテリアナノファイバー マイクロリアクター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気液界面に固体粒子が吸着することにより気相中で安定化された液滴はリキッドマーブル (liquid marble) と呼ばれ、基材に濡れ広がることなく、また、その集合体は粉体のように振る舞うため、コロイド界面化学や材料化学の分野で注目を集めている。また、リキッドマーブルは、(1)調製が容易、(2)気相中で液滴成分をそれぞれ隔離できる、(3)本液滴の気液界面は構成粒子で完全に埋まっているわけではないので、自由な気液界面が維持でき、気体透過が可能、(4)転がして運ぶことができるといったユニークな特徴を有している。

一方、セルロースナノファイバーは、太さが 4-100 nm、長さが 5  $\mu\text{m}$  以上のセルロースのことであり、鋼鉄の 10 倍に匹敵する引張破断強度を持ち、木材などの植物に大量に含まれることから、近年、新規の低環境負荷グリーンナノ材料として期待され、様々な分野において補強用ナノ材料としての利用が活発に検討されている。中でもバクテリアナノセルロースは、微生物が分泌するセルロースナノファイバーであり、植物由来セルロースナノファイバーのようにリグリン・ヘミセルロースなどのファイバー成分の除去が必要無い。

そこで、微小なリキッドマーブル集合体を好気性微生物の培養場として利用すれば、リキッドマーブルのユニークな特徴を活かしたバクテリアナノセルロース生産のための新規マイクロリアクターシステムの構築が可能となる。

### 2. 研究の目的

気液界面に固体粒子が吸着することにより気相中で安定化された液滴であるリキッドマーブルの集合体を好気性微生物用のマイクロリアクターとして利用した新規のバクテリアナノファイバー生産システムの構築を目指す。すなわち、微生物を含む  $\mu\text{L}$  スケールのリキッドマーブルを大量に使用し、リキッドマーブル液滴が接触しても合ーしないため、それらを「転がす」ことによってコア液の攪拌、気液界面を通じた酸素供給の促進を行い、好気性培養により生体ファイバー成分の生産を行う。さらに培養後は培養液を含むリキッドマーブルを「転がす」ことによって輸送し、有用成分の回収を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) リキッドマーブル(LM)の調製条件の探索

モデルナノ粒子としてステアリン酸カルシウムマイクロ粒子を用い、マイクロ粒子ベッドに水溶液を滴下することにより LM の調製を行った。滴下コア液容量と形成される LM のサイズの間関係を調べ、また、調製した LM 単体の物性について調べた。

#### (2) LM におけるモデル好気性細菌の培養

得られたリキッドマーブル(LM)の調製条件を元に、モデル好気性細菌の培養について検討した。モデル細菌として枯草菌を用いた。ステアリン酸カルシウムマイクロ粒子ベッドに菌体液を滴下することにより菌体含有 LM を調製し、環境湿度を高めた条件で 37  $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間静置培養を行った。培養後、LM コア液を回収し、シャーレで培養し、コロニーを観察した。

#### (3) LM における酢酸菌の培養と BF の産生

ステアリン酸カルシウムマイクロ粒子ベッドに酢酸菌液を滴下することにより酢酸菌含有 LM を調製し、環境湿度を高めた条件で、30  $^{\circ}\text{C}$  において静置培養を行った。培養後、LM を洗浄し、コア液部分を回収した。

### 4. 研究成果

#### (1) リキッドマーブル(LM)の調製条件の探索

リキッドマーブル(LM)を形成するモデル固体粒子として、これまで申請者が固体粒子エマルジョンの形成で実績のあるステアリン酸塩マイクロ粒子を用い、リキッドマーブルの調製条件について実験的に検討した。モデル粒子として食品添加物であるステアリン酸カルシウムマイクロ粒子を用い、マイクロ粒子ベッドに水溶液を滴下することにより LM の調製に成功した(図 1)。また、滴下コア液容量と形成される LM のサイズの間関係を調べたところ、滴下容量の増加とともに LM 高さは増加するが、その後、一定となり最大高さが存在することを見出した(図 2)。さらに調製した LM 単体の物性について調べた。LM の機械的強度はそのままでは脆弱であるが、コア液に生体ポリマーを導入することによりその強度が高められることを明らかにした。また、定温定湿度条件下で LM の重量変化を測定し、LM の乾燥速度を算出した。本データから LM の乾燥速度曲線を求めたところ、典型的な湿潤粉体の乾燥速度曲線が得られ、LM 表面の粉体層から水分が連続的に蒸発していることがわかった。さらに、コア液に含まれる成分(塩など)によって乾燥速度に違いが見られ、適切なコア液成分を選択することによって LM からの蒸発徐放制御が可能であることを明らかにした。これらは LM の乾燥挙動についての初めての報告例であり、

LM をマイクロリアクターとして利用する際の重要な知見である。

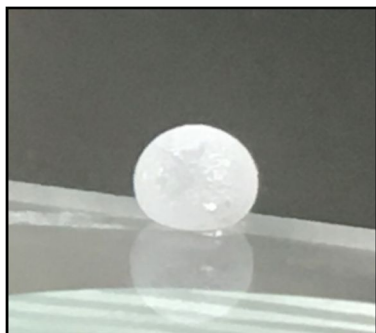


図 1. ステアリン酸塩マイクロ粒子によって調製された LM

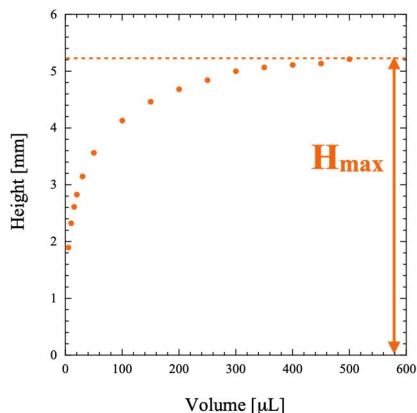


図 2. 滴下コア液容量と形成される LM の高さの関係

### (2) LM におけるモデル好気性細菌の培養

明らかにしたリキッドマープル(LM)の調製条件を元に、バクテリアファイバー(BF)産生菌培養の前段階として、モデル好気性細菌(枯草菌)の培養について検討した。まず、枯草菌を含む培養液をコア液として封入した LM について、環境湿度を高めた条件で 24 時間インキュベートしたところ、コア液内の菌体数は大きく増加した。この結果は LM 界面において酸素透過が十分に行われていることを示唆している。さらに、試験管による培養との比較を行ったところ、LM による培養は、酸素が十分に供給される条件の試験管よりも菌体の増殖数が多く(図 3)、本系が好気性微生物の培養媒体として優れていることが明らかとなった。

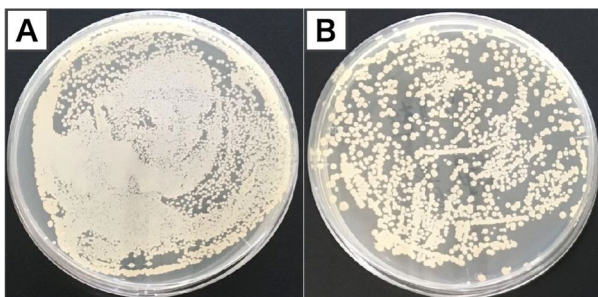


図 3. LM 培養(A)及び試験管静置培養(B)から採取した枯草菌のコロニー写真

### (3) LM における酢酸菌の培養と BF の産生

LM 内で酢酸菌の培養を行った。培養後の LM を洗浄したところ、LM と同形状のゲル状物質が回収された(図 4)。これは酢酸菌によって産生された BF がハイドロゲルの状態で得られたと考えられる。そこで、得られたハイドロゲルを乾燥し、電子顕微鏡で観察したところ、セルロース繊維を確認した。このように本系において好気性の酢酸菌による BF の産生に成功した。また、LM コア液量の影響について検討したところ、コア液量の増大に伴い、より大きな BF ゲルが形成され、ゲルサイズの制御が可能であることが示された。

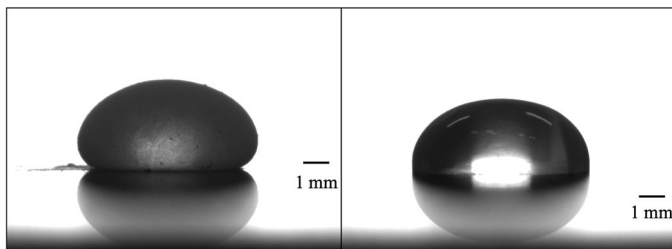


図 4. 酢酸菌含有 LM と回収した BF ハイドロゲル

コア液量を変化させた時の LM1 個あたりの BF 産生重量を求めたところ、コア液量の増加に伴い、BF 産生量は直線的に増加した。また、培養時間とともに BF 産生量は増加し、本培養条件において BF 産生量は 4 日間で一定となった。さらに BF 産生速度を算出したところ、LM 系における BF 産生速度は一般的な試験管培養に比べて 4 倍以上となった。このことは LM 群を用いることにより、従来のフラスコ等による静置培養に比べ、高効率での BF 生産が可能となることを

示している。

LM系で得られたBFハイドロゲルの表面構造についてSEMによる観察を行なったところ、試験管及び三角フラスコで産生されたBFに比べ、繊維が太く、また、より網目状の構造を示し、本系において特有の構造を持つBFが産生されていることが示された(図5)。そこで、各BFのファイバー幅を測定したところ、LM系で産生されたBFの平均ファイバー幅は従来の試験管、三角フラスコで産生されたものより大きかった。さらにLM系で得られたBFゲルの内部の構造について詳細に調べたところ、内側の平均ファイバー幅及び構造は試験管及び三角フラスコで産生されたものとほぼ一致し、LM系における特有のBF構造はLM表面でのみ形成されていることが明らかとなった。このことは本系で産生されるBFが非対称の構造を持ち、従来のBFとは異なる透過能や吸着能を有する可能性を示すものであり、今後の新規分離膜や吸着剤としての展開が期待される。また、LM系で得られたBFハイドロゲルについてその保水性を調べたところ、従来の試験管及び三角フラスコで調製されたBFハイドロゲルの3倍の保水性を有していることを明らかとなった。本結果はBFハイドロゲルの汎用性の拡大につながるものであり、有益である。

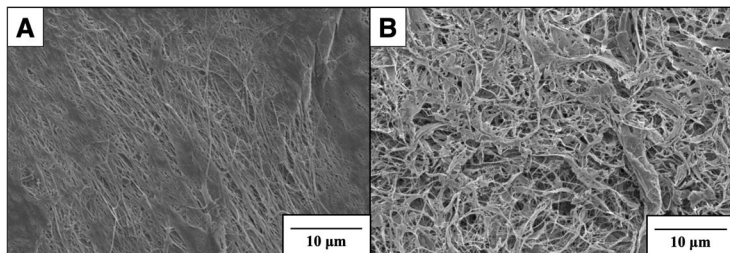


図5. 試験管で産生したBF(A)とLMで産生したBF(B)のSEM写真

一方、リキッドマーブルロータリー培養システムを構築し、菌体含有LMの培養とBFの生産を試みた。本システムを使用してLMの培養を行なったが、LMがうまく転がらず、通常の静置培養との違いが見出せなかった。そこで、LM群を用いたBFの量産体制の確立を目指し、LM群の調製システムを構築した。粉体を散布した斜面に液滴を滴下し、転がすことでLMを調製する装置を試作した。斜面角度、回転移動距離を変えることにより、LM粉体層厚さの制御に成功した。さらに実際に培養産生を行い、粉体層厚さによるBF産生量制御の可能性を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamakawa Kureha, Hirobe Airi, Honjo Satoshi, Higashio Koko, Sawai Jun, Naoe Kazumitsu, Imai Masanao	4. 巻 126
2. 論文標題 Stearate Liquid Marbles for Bacterial Cellulose Production: Influence of the Liquid Marble Interface on Bacterial Cellulose Properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 1611 ~ 1622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c08597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Shoma, Okano Hiroaki, Matsuda Nobuyuki, Sawai Jun, Naoe Kazumitsu, Imai Masanao	4. 巻 191
2. 論文標題 Preparation of Biocompatible Liquid Marbles Stabilized by Food-Grade Stearate Microparticle for Aerobic Bacteria Cultivation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1684 ~ 1694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12010-020-03299-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 本條悟史, 澤井 淳, 今井正直, 直江一光
2. 発表標題 ステアリン酸塩リキッドマーブルの調製条件による産生バクテリアセルロースへの影響
3. 学会等名 化学工学会第88回年会, PA138
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木盛悟, 直江一光
2. 発表標題 ステアリン酸塩マイクロ粒子リキッドマーブルの量産技術に関する基礎的検討
3. 学会等名 第25回化学工学会学生発表会(オンライン), N04
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本條悟史, 澤井淳, 今井正直, 直江一光
2. 発表標題 ステアリン酸塩リキッドマールでのバクテリアセルロース産生に対するコア体積の影響
3. 学会等名 第54回化学工学会秋季大会, PC340
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Honjo, S., Hirobe, A., Naoe, K., Imai, M., and Sawai, J.
2. 発表標題 Stearate Liquid Marbles for Bacterial Cellulose Production: Preparation conditions of Bacterial Cellulose
3. 学会等名 19th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCChE) Congress, Paper ID: 1109 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 広部愛莉, 山川紅葉, 東尾瑚子, 澤井淳, 直江一光, 今井正直
2. 発表標題 ステアリン酸塩マイクロ粒子リキッドマールで産生したバクテリアセルロースの特性
3. 学会等名 第24回化学工学会学生発表会 (オンライン), H11
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本條 悟史, 澤井淳, 直江一光, 今井正直
2. 発表標題 ステアリン酸塩マイクロ粒子リキッドマールで産生したバクテリアセルロースの産生条件
3. 学会等名 第24回化学工学会学生発表会 (オンライン), H10
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山川紅葉, 東尾瑚子, 澤井淳, 直江一光, 今井正直
2. 発表標題 ステアリン酸塩マイクロ粒子リキッドマールを用いた酢酸菌によるバクテリアセルロースの産生
3. 学会等名 第23回化学工学会学生発表会(オンライン), J05
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka, S., Matsuda, N., Okano, H., Naoe, K., and Imai, M.
2. 発表標題 Preparation of Liquid Marbles Stabilized by Stearate Microparticles for Bioencapsulation
3. 学会等名 14th Asian Conference of Biotechnology, P2-121 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka, S., Matsuda, N., Okano, H., Naoe, K., and Imai, M.
2. 発表標題 Properties of liquid marbles stabilized by stearate microparticles for microreactors
3. 学会等名 5th European Congress of Applied Biotechnology, P28 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka, S., Matsuda, N., Okano, H., Naoe, K., and Imai, M.
2. 発表標題 Preparation of liquid marbles stabilized by stearate microparticles
3. 学会等名 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA), P1.93 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中咲磨, 岡野浩明, 松田信之, 直江一光, 今井正直
2. 発表標題 ステアリン酸塩マイクロ粒子リキッドマーズルの調製とその特性
3. 学会等名 第50回化学工学会秋季大会, PA224
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等 <a href="https://chemhp.chem.nara-k.ac.jp">https://chemhp.chem.nara-k.ac.jp</a>
--

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今井 正直  (Imai Masanao)  (80193655)	日本大学・生物資源科学部・教授   (32665)	
研究分担者	澤井 淳  (Sawai Jun)  (80288216)	神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授   (32714)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------