

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18726

研究課題名(和文)中空球状バクテリアセルロースの生産性向上と材料特性評価

研究課題名(英文)Productivity Improvement and Characteristics Evaluation of Hollow-type Spherical Bacterial Cellulose

研究代表者

星 徹 (HOSHI, Toru)

日本大学・理工学部・助教

研究者番号：30513973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：中空球状バクテリアセルロース(BC)ゲルは、動粘度の異なるS.Oilの利用や界面活性剤の添加によって、オイル中で安定に浮遊させた培養液滴中で酢酸菌を培養することで、中空球状BCゲルの回収率が90%以上と生産性が飛躍的に向上することを明らかにした。  
中空球状セルロースゲルの外殻は、セルロース繊維が複雑に絡み合った網目構造から成る非常に薄いゲル膜で構成されており、中空体内部に充てんしたモデル薬物は、Fick型拡散によって迅速にゲル外へ放出した。薬物放出モデルのHiguchi modelと良好に一致し、中空球状BCゲルのセルロースゲル膜は、網目密度および膜厚が均一であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We studied newly development cultivating system for bacterial cellulose (BC) production with desired shapes, such as hollow and spherical ones without any molds or templates. Using two silicone oils with different density separated each other, the aqueous medium droplets containing *Acetobacter Xylinum* could float between them with making disk-like form. Well-mixed silicone oils by adding a surfactant were used to control the density precisely to enable the droplets floating well. The bacteria produced the fibrils of BC at outer interfaces of the medium droplets and the interfaces would become stable with maintaining of the spherical shape. After cultivation the hollow-type BC gels were measured to characterize the gels. Scanning electron microscopic view proved the hollow structure and well-organized fibril networks and they comprised type-I crystal structure of the cellulose. Release behavior of FITC-dextran from hollow-type spherical BC gel excellently agreed to Higuchi model.

研究分野：高分子材料化学

キーワード：バクテリアセルロース 中空球状 形態制御 Water-in-Oil 酢酸菌

### 1. 研究開始当初の背景

バクテリアセルロース(BC)ゲルを圧縮乾燥したシート状BCは、音響用振動板や複合材料に応用されている。ゲル形態としては、主に食品(ナタデココ)に利用されているが、セルロースゲルとしての応用は、(1)BCゲルが培養時の容器形状で得られるため、形状の自由度が低い、(2)セルロース繊維が緻密な網目構造を形成しており、切り出しによる微細加工に適していない、(3)不溶かつ不融であるため、一般的な高分子の成型法を適用できない、などの理由により広く行われていない。BCゲルの応用研究の例として、細胞培養用足場材料としての球状ゲルや人口血管としてのチューブ状BCゲルが報告されている。球状BCゲルは攪拌培養により、チューブ状BCゲルは酸素チャンバー中で培養液を充てんした高酸素透過性チューブ内での静置培養によりそれぞれ調製されている。このように保湿性、生体親和性、生分解性、機械的性質に優れたBCゲルの応用展開には、BCゲルの形状制御が非常に重要である。

我々は最近、各種オイル中に浮遊させた培養液滴中で酢酸菌(*A. xylinum*)を培養する新規方法により、報告例のない中空球状BCゲルが得られることを見出した。これまでに報告されている中空状BCゲルは、攪拌培養により得られているが、粒径が不均一かつ歪な形状であった。新規培養法である『オイルに浮遊させた培養液滴を用いた静置培養』の特徴を明らかにすることで、今まで得ることができなかったより小さく均一な球形、かつ中空状のBCゲルの調製が期待される。

形状制御したBCゲルの応用研究は前述の球状およびチューブ状があるが、中空球状BCゲルの応用研究例はない。その理由はBCゲルの形状制御が困難であり、中空球状BCゲルの量産ができなかったことに起因する。中空球状BCゲルは、内部に空洞を有することから、空洞内に様々な物質の充填が可能であり、通常のBCゲルと比べ膜厚が薄いため、空洞内の液体がゲル外へ迅速に放出されると思われ、薬剤カプセルなどの医療分野や食品分野への応用が期待される。このような応用研究に発展させるには、中空球状BCゲルの材料特性を明確にする必要があるため、再現性良く大量に調製する方法の確立が重要である。

### 2. 研究の目的

我々の研究室では、油と培養液の界面でBCゲルが産生することに着目し、『オイルに浮遊させた培養液滴を用いた静置培養』により中空球状BCゲルの調製が可能であることを見いだした。具体的には、互いに非相溶であり比重の異なるシリコンオイル同士を混合した油中に酢酸菌を植菌した培養液を滴下し、二相の油界面で液滴を球状に保持したまま静置培養することで、中空球状BCゲルを調製した。しかしながら、前述の従来法

では滴下した培養液滴の容器壁面への付着や培養液滴同士の接触による大きな液滴の形成など、得られる中空球状BCゲルの形状と粒径制御が困難である。

従来法で中空球状BCゲルを再現性良く大量に調製するには、油中に培養液を大量に滴下する必要があるが、培養液滴同士が接触しやすい。そのため、1つの容器に1滴培養液を滴下するなど、培養液滴を孤立させた状態で培養を行うといった工夫が必要であり、大量生産には適していない。そのため、培養液滴同士が接触しても液滴を維持させる必要がある。そこで、本研究では酢酸菌の生育やBC産生能に影響を与えないことが確認されている非イオン性界面活性剤を用いることで、油中での培養液滴の分散安定性を向上させ、中空球状BCゲルを再現性良く大量に調製するとともに基礎物性の評価を目的とする。

### 3. 研究の方法

中空球状BCゲルの応用展開のための基礎を確立するために、中空球状BCゲルの生産性向上の検討、ゲルの形成機構の解明、膜厚および構造制御および物性の評価を行う。

#### (1)界面活性剤の添加による中空球状BCゲルの生産性向上

酢酸菌の生育を阻害しないことが知られている非イオン性界面活性剤を培養環境中に加えることで、液滴同士の融合の防止を検討した。中空球状BCゲルの調製は、油中に水を滴下したWater-in-Oil(W/O)型分散系であるため、W/O分散系に適したHLB値の低いSpanシリーズ(HLB値1.8~8.6)を用いて、2週間程度培養液滴が安定に分散し、良好に中空球状BCゲルが得られるオイルと界面活性剤の組み合わせを検討し、中空球状BCゲルの生産性の向上を試みた。

#### (2)オイルの酸素透過性とセルロース産生量の関係

空気-培養液界面で産生したBCゲルは、厚さ方向に積層構造を形成する。オイル-培養液界面でも同様に積層構造を形成するため研究計画時には、中空球状BCゲルの培養日数による膜厚制御の検討を行う予定であったが、中空球状BCゲルの場合、半径の大きい培養液滴表面から半径の小さい中心部に向かって膜厚が成長するため、培養日数を変化させてもごく薄い一定の膜厚以上に成長しなかった。しかしながら、セルロースゲル膜を構成するセルロース繊維密度が大きくなる傾向であることを確認した。そこで、試験管を用いた培養実験によりオイル-培養液界面の面積を一定にして、培養日数とセルロース産生量の関係性を評価した。また、酢酸菌は好気性細菌であることから、各種オイルの酸素透過性がセルロースの産生に影響すると予想される。溶存酸素センサーを用い

て培養液の酸素濃度とセルロース産生量の関係を評価した。

### (3)中空球状 BC ゲルの形態と物性評価

中空球状 BC ゲルの物性は、その形態により大きく異なることが予想される。中空球状 BC ゲルの形態と物性を評価し、中空球状 BC ゲルの材料特性を明確にする。

#### 中空球状 BC ゲルの形態観察

中空球状 BC ゲルは水を含むため、直接、走査型電子顕微鏡 (SEM) によるゲルのミクロ構造観察ができない。そのため、超臨界乾燥技術により中空球状 BC ゲルのミクロ構造を破壊せずにエアロゲル化し、その後 SEM による形態観察を行った。

#### 中空球状 BC ゲルの物質透過性評価

BC ゲルはセルロース繊維による網目構造を形成しているため、網目間の空隙を通して溶媒や溶質がゲル内外と拡散移動することが知られている。中空球状 BC ゲルでもゲル膜中を物質が拡散移動により透過することが考えられる。そこで、蛍光標識化デキストラン (FITC-Dex) (Mw:10,000) をモデル薬物として、中空球状 BC ゲルの薬物放出挙動を評価した。

## 4. 研究成果

### (1)中空球状 BC ゲルの大量調製法の検討

大量調製を行う上で良好に中空球状 BC ゲルを得られるシリコンオイルと界面活性剤の組み合わせの検討を行った。シリコンオイルは比重 0.96 と 1.07 の二種類を体積比 1:1 で混合した混合オイル 100 mL を用いた。界面活性剤を加えずに比重 0.96 のシリコンオイルの動粘度を 100, 350, 500 mm<sup>2</sup>/s と変えて実験を行ったところ、動粘度が高いほど直径 2 mm 程度の中空球状 BC ゲルを多く回収することができた。しかし、半球状の BC ゲルも存在しており、これは互いに非相溶であるシリコンオイルを混合しているため、静置培養中に混合油の分離が進行し、その際に培養液滴も連なって移動し、培養容器壁面に接触した状態でセルロースの生産が進行したためである。また、前述の理由から培養液滴同士が接触融合を起こし、得られる中空球状 BC ゲルの粒径が大きくなるものが多く、シリコンオイルの粘度を変化させただけでは安定して中空球状 BC ゲルを得ることは困難である。

次に、Span シリーズで最も溶解性、操作性が本実験に適していた Span 85 (ソルビタントリオレート) を界面活性剤として 10 g 加え、同様の実験を行ったところ、Span 85 無添加のもの比べて一定の粒径の中空球状 BC ゲルの回収量が飛躍的に向上した。特に動粘度 500 mm<sup>2</sup>/s の比重 0.96 と 1.07 のシリコンオイルの混合系では、滴下した培養液とほぼ同数の中空球状 BC ゲルを回収する

ことに成功した。しかし、シリコンオイルと Span 85 の混合が不完全な状態では、中空球状 BC ゲルが産生される前にシリコンオイルが分離する。24 時間攪拌した混合オイルを用いることで、シリコンオイルの分離が抑制され、油中の液滴が滴下位置で留まって培養を進行させることに成功した。

以上の事より、Span 85 を混合油中に均一に分散させることで、液滴同士の接触による液滴の巨大化を抑制し、かつ混合油の分離が緩やかになることで、滴下した培養液滴数の 9 割近くを中空球状 BC ゲルとして回収することに成功した。

### (2)オイルの酸素透過性とセルロース産生量の関係

調製した培養液の 23 における溶存酸素量は 6~7 ppm 程度であり、この培養液を空気バブリングにより酸素飽和状態にすると 8.39 ppm、窒素バブリングにより脱酸素を行うと < 0.01 ppm となった。これら 3 種の培養液を用いてオイル - 培養液界面で生産する BC 量と培養日数の関係を図 1 に示す。

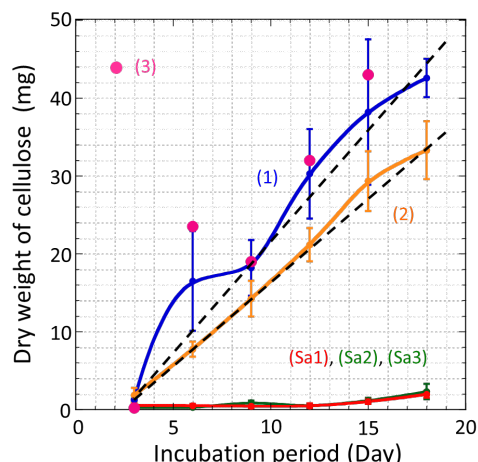


図 1 溶存酸素量の異なる培養液を用い、オイル - 培養液界面で産生するセルロース量と培養日数の関係

サラダ油とシリコンオイルを疎水性液体として用いた場合の BC 産生量はシリコンオイルを用いた方が多い。サラダ油を用いた試料(図中 Sa1, Sa2, Sa3)では、バブリングの効果は見られず、BC 産生量に明確な差は現れなかった。これは、外部からの酸素を得られない中で、溶存酸素のみを用いて BC が産生されたためと考えられる。

シリコンオイルを用いた試料において、空気バブリングを行った(1)とバブリングを行っていない(2)を比較すると、(1)の方が BC をより多く産生しており、傾きが急なことから高い産生速度をもつことが確認された。溶存酸素がほぼ 0 ppm の培養液を用いた(3)の場合、飽和状態の(1)と同等の BC 産生量を示した。培養液中の初期酸素濃度が 0 ppm であるため、油と培養液中の酸素濃度の差が大き

く、培養液側に酸素が溶け込みやすいため、シリコンオイル - 培養液界面で酸素濃度が高い状態で培養が進行したと考えられる。そのため、溶存酸素がほぼ存在しない条件でも BC 産生量が多いことが明らかとなった。

以上のことより、培養液 - 疎水性界面で産生する BC ゲルは、疎水性液体の種類と培養液中の溶存酸素量が BC 産生量に影響を与えることが明らかとなり、短い培養時間で中空球状 BC ゲルを得るには、酸素飽和させた培養液を用いることが適している。

### (3) 中空球状 BC ゲルの形態と物性評価

#### 中空球状 BC ゲルの形態観察

通常の静置培養で得られた BC ゲル(図 2 (a))と中空球状 BC ゲル(図 2 (b))の写真とそれぞれのエアロゲルの SEM 画像を示す。中空球状 BC ゲルには、最も回収量の多い条件で調製した直径 2mm の試料を用い、中空体内表面の観察を行った。両者ともに数十～数百 nm から成るセルロース繊維が複雑に絡み合った三次元網目構造を確認した。多少ではあるが、中空球状 BC ゲルの方が、セルロース繊維径が大きいように思われる。

実験項(3)でも述べたが、中空球状 BC ゲルの膜厚は増加せず、ごく薄い膜厚のままであった。中空球状 BC ゲルの形成過程において、オイル - 培養液界面でセルロースのゲル膜が生成する。静置培養と同様に積層構造を形成するには、このゲル膜が球体の中心方向に移動しなければならない。しかしながら、球体の中心方向は半径が小さくなる方向のため、膨潤しているゲル膜が縮まり、中心に向かって膜厚が増加することは考えにくい。そのため、オイル - 培養液界面で生成したセルロースのゲル膜中で、酢酸菌の生育が起るため、セルロース繊維密度が大きくなると思われる。セルロース繊維密度が大きくなることで、一部のセルロース繊維同士の凝集が起るため、静置培養と比較して、繊維径が大きくなったと考えられる。

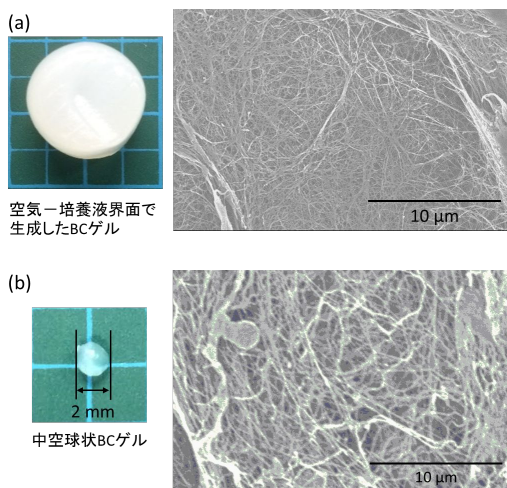


図 2 ゲルの見た目と SEM 画像  
(a) 空気 - 培養液界面で生成した BC ゲル  
(b) 中空球状 BC ゲル

### 中空球状 BC ゲルの物質透過性評価

図 3 にモデル薬物として蛍光標識デキストラン水溶液を中空球状 BC ゲルおよび空気 - 培養液界面での静置培養によって得られた BC ゲル(general BC)に充填させた後、純水中での時間毎の放出量を紫外可視分光法

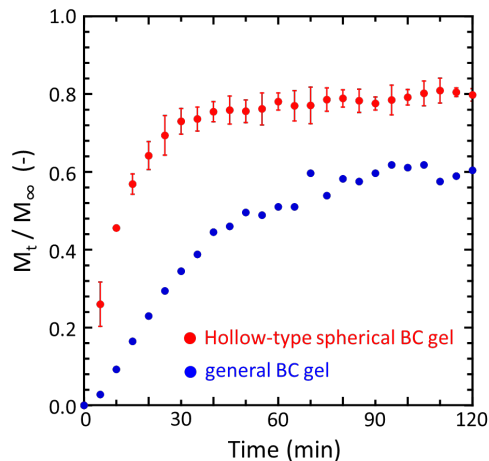


図 3 中空球状 BC ゲルと静置培養で得られた BC ゲルの 25 における薬物放出挙動

にて測定した結果を示す。t は測定時間、 $M_t$  は時間ごとの放出量、 $M$  は最大放出量である。まず、中空球状 BC ゲルでは、薬物の放出速度が比較的速いのにに対し、general BC は薬物放出にタイムラグが生じかつ放出速度も遅いという結果になった。中空球状 BC ゲルはセルロース繊維から成る非常に薄いゲル膜の単一層構造のため、中空体内部に充てんされた物質は迅速にゲル外へ放出される。対して、general BC はセルロースゲル膜の積層構造のため、ゲル内に取り込まれている物質は何層もの網目を通過してからゲル外へ放出されるため放出に時間がかかると思われる。このように、中空球状 BC ゲルと Basic BC では、薬物の放出挙動が大きく異なることが明らかとなった。

中空球状 BC ゲルの薬物放出挙動を詳しく調べるため、Korsmeyer-Peppas model を用いて、評価を行った。

$$M_t / M = K \cdot t^n \quad (1)$$

$$\ln(M_t / M) = \ln K + n \cdot \ln t \quad (2)$$

式(1)および(2)は  $M_t / M < 0.6$  で成り立ち、この時の n の値により放出挙動を判別することができる。また、薬物を導入した固体(ゲルを含む)からの放出挙動は、固体の形状にも依存し、薄膜:  $n = 0.5$  (Higuchi model)、円柱状:  $n = 0.45$ 、球状:  $n = 0.43$  である。薄膜状試料の Fick 型拡散の場合、薬物の放出速度は  $t^{-0.5}$  に依存することが知られている。中空球状 BC ゲルの放出挙動は、 $n = 0.496$  とほぼ 0.5 であり、放出速度は  $t^{-0.551}$  に依存したことから、薄膜状試料の Fick 型拡散を示すことが明らかとなった。薬物を含むゲルの形状が中空『球状』であるにも関わらず、薄膜状試料の Fick 型拡散挙動を示すことから、

ゲル膜の膜厚および網目密度が均一であり，  
どの方向からでも薬物が同じ速度で放出さ  
れていることを明らかとした．

<引用文献>

Wojciech Czaja, Dwight Romanovicz, R.  
Malcolm Brown Jr., Structural  
investigations of microbial cellulose  
produced in stationary and agitated  
culture, Cellulose, 11, 2004, 403-411

Ananda Putra, Akira Kakugo,  
Hidemitsu Furukawa, Jian P. Gong,  
Yoshihito Osada, Tubular bacterial  
cellulose gel with oriented fibrils on the  
curved surface, Polymer, 49, 2008,  
1885-1891

Yang Hu, Jeffrey M. Catchmark,  
Formation and Characterization of  
Spherelike Bacterial Cellulose Particles  
Produced by Acetobacter xylinum JCM  
9730 Strain, Biomacromolecules, 11,  
2010, 1727-1734

J Siepmanna, N.A Peppas, Modeling of  
drug release from delivery systems  
based on hydroxypropyl methylcellulose  
(HPMC), Advanced Drug Delivery  
Reviews, 2001, 48, 139-157

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

佐藤雄紀，星徹，萩原俊紀，青柳隆夫  
中空球状バクテリアセルロースゲルの高効  
率調製

第65回高分子学会年次大会，  
2016年5月25日に神戸国際会議場・展示場  
(兵庫県神戸市)にて発表

〔その他〕

ホームページ

<http://aoyaginims.wixsite.com/mysite>

6．研究組織

(1)研究代表者

星 徹 (HOSHI, Toru)

日本大学・理工学部・助教

研究者番号：30513973