

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22088

研究課題名（和文）有用微生物を固定化するカプセル化微生物製剤の創製と発酵型土壌改良への応用

研究課題名（英文）Preparation of microcapsules immobilized useful microorganisms and their application to fermentation soil improvement

研究代表者

吉田 昌弘（Yoshida, Masahiro）

鹿児島大学・理工学域工学系・教授

研究者番号：50315397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、土壌環境中で有用微生物（乳酸菌や酵母菌）の働きを最大限に発揮させるため、有用微生物を環境分解性のマイクロカプセルに固定化し、土壌環境を効果的に改善できる新しい製剤の開発を行った。有用微生物を固定化するマイクロカプセルの開発ならびにそのマイクロカプセルに固定化された有用微生物の発酵特性の評価し、実証試験に繋げた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消費者の食に対する安全性への意識が高まるなか、有機農業の必要性が重要視され、生産者間で注目を集めているが土壌改良可能な有用微生物を含む微生物資材である。しかしながら、全ての土地において安定した微生物資材中の有用微生物の効果を得られていないのが現状である。様々な土地形態や環境に対して有用微生物の働き及び自然力を完全に活かすことのできるマイクロカプセルを開発することが本研究成果の学術的意義である。また、新しい土壌改良資材として土壌環境の改善を試み、消費者の食に対するクオリティーライフ向上させるという社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In this research, in order to maximize the action of useful microorganisms (lactic acid bacteria and yeast) in the soil environment, a new formulation that can effectively improve the soil environment by immobilizing the useful microorganisms in environmentally degradable microcapsules was developed. We developed microcapsules that immobilize useful microorganisms and evaluated the fermentation characteristics of the useful microorganisms immobilized in the microcapsules, which led to a verification test.

研究分野：化学工学

キーワード：microencapsulation microorganism biomaterial

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、農薬や化学肥料の乱用が大地の荒廃を促進し、社会問題となっている。このような農薬や化学肥料の過用や誤用は農業生産環境を破壊するのみならず、生産物に対する安全性はもとより、保険性についても多くの問題を生じ、消費者の健康を脅かしている。これらの問題の根本的な解決には、その原因となる農薬や化学肥料を使用しなくても、コスト的にそれを上回る効果を出す新しい技術の開発が望まれている。

微生物資材とは、「土壌等に施された場合に、表示された特定含有微生物の活性により、用途に記載された効果をもたらす資材」と定義され、表示される効果には有機物の分解促進、連鎖障害抑止、土壌の理化学性改善、土壌微生物相の改善、作物の生育促進等が挙げられる。資材の形態は乳酸菌や酵母菌等の有用微生物を有機物(堆肥)と混合したもの、微生物を鉱物に吸着したものが、これらを土壌に散布することで有用微生物が土中の微生物相を直接コントロールし、腐敗菌の占有する腐敗型土壌を発酵型微生物の占有する発酵型土壌へと転換することを目的としている。これは農薬や化学肥料のように作物に直接的に薬理効果を与えるのではなく、作物の生育する土壌そのものの環境を改善させることで、作物に自然な栄養を与えるという地球に優しい農業ともいえる。

しかしながら、微生物資材中の有用微生物は土壌や鉱物に吸着させただけであるため、土中でほぼフリーの状態が存在する。そのため、土壌中のわずかな pH、温度、湿度変化が微生物の活性に大きく影響する。このように微生物は土壌環境に対し非常に敏感な性質を持つため、環境の変化や厳しい環境の農地などで表示される効果を得られず、効果が安定しないという現実的な問題がある。さらに、流通や保存性能に乏しいという問題もある。このように、微生物を土壌で機能させるための手法は確立されていないという背景があった。

2. 研究の目的

本研究課題では、土壌環境中で有用微生物(乳酸菌や酵母菌)の働きを最大限に発揮させるため、有用微生物を環境分解性のマイクロカプセル(MC)に固定化し、外部環境からの保護、長年に渡る徐放制御から有用微生物を効率的に土壌に定着させ、土壌環境の改善が可能な新しい製剤の開発を目的としている。本研究課題では、有用微生物を包括固定化する MC の開発ならびにその MC に固定化された有用微生物の発酵特性の評価を行い、実証試験に繋げた。

3. 研究の方法

(1) 有用微生物(乳酸菌および酵母菌)の培養

微生物資材中の有用微生物 6 種を同時に内包するマイクロカプセルの調製を行うため、有用微生物 6 種の培養を行った。乳酸菌 4 種 (*Lactobacillus bulgaricus* NBRC 13953, *Lactobacillus acidophilus* NBRC 13951, *Lactobacillus plantarum* NBRC 3070, *Lactobacillus lactis* NBRC 3073) 及び酵母菌 2 種 (*Saccharomyces cerevisiae*(Baker's yeast Type), *Saccharomyces sake* NBRC 0304)をそれぞれ 803 培地中でロータリーシェイカー(30)にて好気培養することで菌体を増殖させ、遠心分離機(8000rpm,5 分間)にて固体として回収した。

(2) 有用微生物 6 種を同時に内包するマイクロカプセルの調製

内水相として、微生物保護材であるアルギン酸ナトリウム 1wt%を蒸留水に加え、ビーカー中で

混合攪拌した。さらに、芯物質である有用微生物 0.2g-wet(乳酸菌 0.13g-wet + 酵母菌 0.07g-wet)を、混合攪拌している内水相中に懸濁した。次に、有機相として、カプセル壁材であるポリカプロラクトン (PCL) 5wt%を高分子良溶媒であるジクロロメタン 92%に溶解し、さらに乳化剤であるソルピタンモノオレエート 3wt%を添加し、これらをビーカー中で混合攪拌した。そして、調製した内水相を有機相中へ氷冷下で攪拌しながら添加し、3 分間混合攪拌することで、W/O エマルジョンを形成した。また、外水相として安定剤としてポリピニルアルコール 1wt%と分散安定剤として第三リン酸カルシウム 10%スラリー(TCP10U) 30wt%を蒸留水に加え、恒温ジャケット付反応容器に移し、ジャケット内に冷却水を入れ、バッチ内を 5 に保った。攪拌速度を 100 rpm とし、攪拌下で恒温ジャケット付反応容器中の外水相に対し、調製した W/O エマルジョンをゆっくり挿入した。恒温ジャケット付反応容器内で攪拌することで W/O/W エマルジョンを形成した。恒温ジャケット付反応容器内の温度を 25 に昇温し、1 時間攪拌後、さらに温度を 30 に昇温し、溶媒回収機により 700hPa に減圧し、3 時間攪拌することでジクロロメタンを除去することでカプセルを形成した。調製したマイクロカプセルを 0.5 mol/L 塩酸で洗浄することで TCP10U を除去し、カプセルを回収した。

(3) 調製した有用微生物マイクロカプセルの特性評価

形態観察

調製したカプセルの形態観察は実体顕微鏡を利用した。

カプセル内に固定化した有用微生物の活性評価

調製したマイクロカプセル中に固定化された有用微生物の活性を調査した。グルコースの転化量を微生物活性として評価した。グルコースの代謝物として、乳酸菌から乳酸を、酵母菌からエタノールをガスクロマトグラフにより定量した。

カプセルに固定化した有用微生物の活性向上の検討

有用微生物 6 種を内包するマイクロカプセルの更なる活性向上を目指し、803 培地中にカプセルを添加し、好氣的に攪拌した。固定化した有用微生物の増殖に伴う活性を定量化した。

実証試験

調製した有用微生物内包マイクロカプセルを土壌に適用するため作物および土壌への効果を実証試験により評価した。無添加区域(1アール)を比較対照とし、調製した有用微生物内包マイクロカプセルを適用した区域(1アール)の作物に及ぼす成長促進効果を調査した。

4. 研究成果

(1) 調製したマイクロカプセルの形態観察

調製した有用微生物 6 種(乳酸菌 4 種、酵母菌 2 種)を固定化したマイクロカプセルの形態観察結果を以下に示す。球形で表面は滑らかであり、約 100 μm のマイクロカプセルが調製できた。

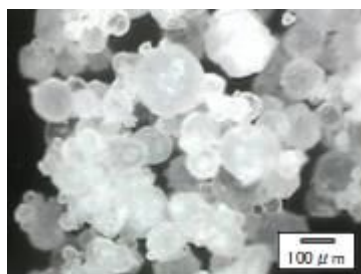


図1 有用微生物マイクロカプセル

(2) 活性評価

調製したマイクロカプセルに固定化された有用微生物の活性を確認するため、グルコースの乳酸やエタノールへの転化量を微生物活性として評価した。図2に乳酸の添加量を、図3にエタノールへの添加量を、図4に市販の微生物資材、*Lactobacillus bulgaricus* NBRC13953株を内包マイクロカプセル、6種の有用微生物を内包したマイクロカプセルの乳酸の最大転化量比較を示す。図4より有用微生物6種を内包するマイクロカプセルは市販の微生物資材に比べ約9倍の活性があり、*Lactobacillus bulgaricus* NBRC13953株を内包マイクロカプセルとほぼ同程度の最大転化量を示した。

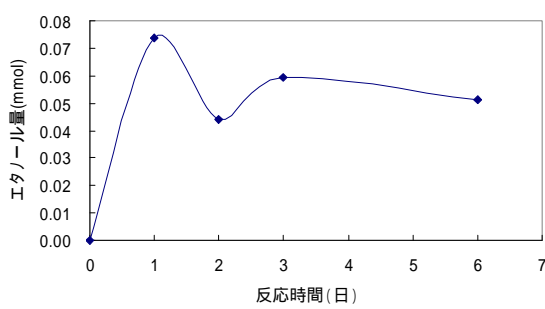


図2 エタノールの転化量

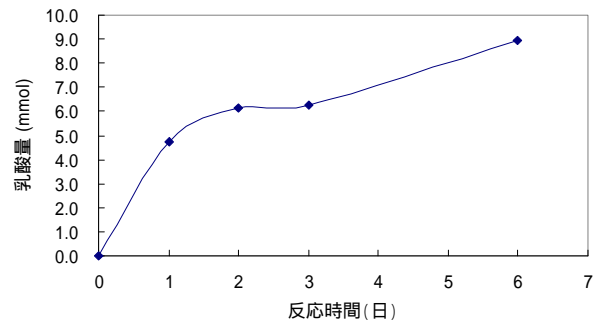


図3 乳酸の転化量

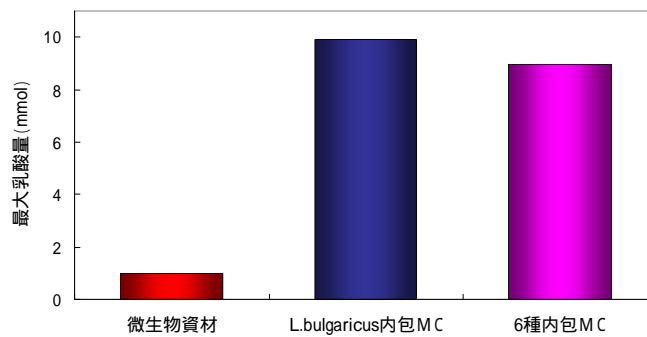


図4 乳酸の最大転化量の比較

(3) カプセルに固定化した有用微生物の活性向上の検討

図5および図6にカプセル調製後、活性向上のため培養操作を行ったカプセルと行っていないカプセルとの間で乳酸およびエタノールの最大転化量比較を示す。

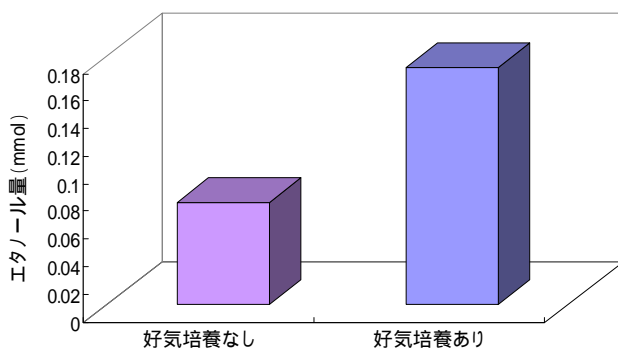


図5 エタノールの最大転化量の比較

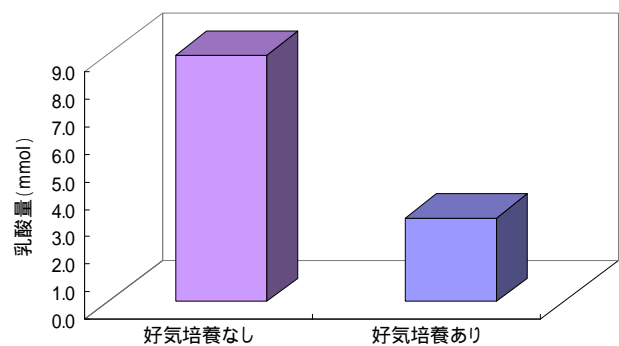


図6 乳酸の最大転化量の比較

活性向上のための培養操作を行った結果、反応試験においてエタノール転化量は上昇したが、乳酸の転化量は低下した。これより、活性向上のための培養操作において酵母菌量が増加し、乳酸菌量が減少したと考察できる。この結果より、有用微生物6種を内包するカプセルについては本活性向上法では乳酸菌の活性を高めることは困難であることが分かった。例えば、乳酸菌4種を内包するマイクロカプセルと酵母菌2種を内包するマイクロカプセルをそれぞれ調製し、これを2:1の割合で混合するなどの利用が必要であろう。

(4) 実証試験

実証試験では、2アールの圃場にて、葉菜類を栽培し、無添加区域(1アール)を比較対照とし、調製した有用微生物内包マイクロカプセルを適用した区域(1アール)の作物に及ぼす効果について調査を行った。図7(a)(b)(c)に葱の成長結果について示す。



図7(a左) 葱の成長(左 無添加区 右 MC区)、(b中央) 無添加区の根元、
(c右) MC区の根元

図7(b)(c)より、無添加区、MC区は根に被害は無く、無添加区に比べMC区は根元部分が太いことが確認できた。また、図7(a)より、無添加区は約45cmであり、MC区は約55cmであった。無添加区に比べMC区は作物の成長促進効果が確認できた。結果として、有用微生物の効果が葱の生長を促していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kouji Haramaki, Yoshihiro Ohzuno, Shiro Kiyoyama, Koichiro Shiomori, Yasuo Hatate, Takayuki Takei, Masahiro Yoshida	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of maintaining activity by addition of sugars for microencapsulated thatch-degrading microorganism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Studies in Science and Technology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 服巻晃志, 大角義浩, 清山史朗, 塩盛弘一郎, 幡手泰雄, 武井孝行, 吉田昌弘
2. 発表標題 サッチ分解菌Bacillus pumilusを内包するマイクロカプセルの保存安定性とセルロースの分解能評価
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服巻晃二, 大角義浩, 幡手泰雄, 武井孝行, 吉田昌弘
2. 発表標題 サッチ分解菌内包カプセルの開発およびその活性保持に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服巻晃二, 大角義浩, 武井孝行, 吉田昌弘
2. 発表標題 サッチ分解菌を内包したカプセルの開発
3. 学会等名 第30回若手ケミカルエンジニア討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服巻晃志, 大角義浩, 清山史朗, 塩盛弘一郎, 幡手泰雄, 武井孝行, 吉田昌弘
2. 発表標題 サッチ分解菌Bacillus pumilusを内包するカプセルの長期安定性とそのサッチ分解能の評価
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 サッチ分解菌含有カプセル及び芝生地の保全方法	発明者 吉田昌弘, 武井孝行, 大角義浩, 服巻晃志, 幡手泰雄	権利者 鹿児島大学, MC ラボ
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-032848	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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	武井 孝行 (Takei Takayuki) (90468059)	鹿児島大学・理工学域工学系・教授 (17701)	

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
---------	---------