

ゲル状培養液を用いた中空球状バクテリアセルロースゲルの調製

Preparation of the bacteria cellulose hollow spherical gel using the gelatinous culture medium

○柿沼祐香¹, 星徹², 萩原俊紀², 澤口孝志²*Yuka Kakinuma¹, Toru Hoshi², Toshiki Hagiwara², Takashi Sawaguchi²

Abstract: We found that bacterial cellulose (BC) was produced by *A. xylinum* in the hydrophilic-hydrophobic interface. Thereby, BC hollow sphere gels were prepared with W/O type droplet of the culture media. However, this method was inadequate for the large-scale production of uniformity BC hollow sphere gels due to formation of large droplets by the contact of some droplets. In this study, we examined the large-scale production of uniformity BC hollow sphere gels using gelatinous culture media droplets.

1. 緒言

バクテリアセルロース(BC)ゲルは酢酸菌の一種により産生され、生分解性や保水性に優れており、様々な分野で応用が期待される。しかし、BCゲルの形状は培養時の容器形状に依存し、調製後の成形が困難である。また、任意の形状への切り出しが難しく、応用される分野が限られる。球状のBCゲルを得る場合、①攪拌しながら培養する、②培養液を球状にして培養する、の2通りが考えられる。攪拌培養によって得られる球状BCゲルは、サイズが小さいほど形状や大きさの揃ったゲルを調製するのが困難である^[1]。そこで、疎水性の液体(シリコンオイル)中に培養液を滴下し分散させ、液滴の状態を保持したまま、静置培養を行ったところ球状BCゲルが生成し、内部は中空状であった^[2]。しかし、培養液を油中に滴下した際に、培養液滴同士が接触すると容易に融合し大きな液滴を形成するため、中空球状BCゲルの粒径制御が困難である。この方法では培養液を大量に滴下する必要があり、培養液同士が接触しやすいため、1つの容器に培養液1滴を滴下するなど、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るが、大量調製には適していない。

中空球状BCゲルの大量調製には、培養液滴同士が接触しても培養液滴を保持させることが必要である。培養液滴の保持には、①培養液に界面活性剤を加え油中で培養液を分散させる、②培養液に増粘剤を加え、培養液滴をゲル化する、の2通りが考えられる。しかし①の場合、界面活性剤は殺菌作用を有し、酢酸菌の代謝を阻害するため良好にセルロースを生成しない。界面活性能を有する多糖類を用いた場合、酢酸菌が多糖類を炭素源としセルロースを生成するため^[3]、培養液中に含まれる多糖類の濃度が低くなり、液滴の分散性が低下するため適していない。そこで本研究では、培養液滴をゲル化することで、シリコンオイル中に大量に培養液を滴下しても、培養液滴同士の接触融合が起こらず大量生産に向けた中空球状BCゲルの粒径調整を目的とする。

2. 実験方法

斜面培地への植菌や培養液、母液の調製は既報に従い行った^[2]。

培養液 100 mL に寒天 2.5 g を 120 °C のオートクレーブにて加熱溶解した後、冷却したサラダオイルにパスツールピペットで滴下し、球体を維持したままゲル化した。次に、ゲル状培養液を母液に浸け込み、10 分程度置いた後にシリコンオイル中(比重 0.96 と 1.07 を混合したもの)に浮かべ、30 °C で所定日数静置培養を行った。その後、生成した BC ゲルを沸騰水中で攪拌することで、BC ゲル内部の寒天を溶解除去した。

3. 結果、考察

培養液に寒天を加熱溶解させ、冷却したサラダオイルにパスツールピペットを用いて滴下したところ、直径約 4 mm の球形のゲル状培養液の調製に成功した(Fig.2(a))。このゲル状培養液を用いて静置培養を行ったところ、培養液が液体の場合とは異なり、培養液滴同士接触しても融合し大きな液滴にならず、培養液滴の粒径制御が期待される。しかし、所定日数間培養を行った際に隣接したゲル同士がつながり、数珠状を形成する BC ゲルを確認した(Fig.2(b))。この数珠

1 : 日大理工・院(前)・応化、2 : 日大理工・教員・応化

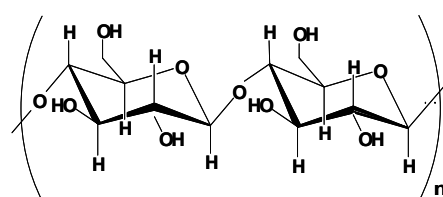


Fig. 1 The structure of Bacterial cellulose.

状 BC ゲルは純水中で攪拌を行っても、個々の球体に分割することはできなかった。ゲル状培養液表面には、酢酸菌を含む母液が付着しており、ゲル状培養液同士が隣接すると表面に存在する母液がつながる。母液中の酢酸菌もセルロースを生産するため、ゲル同士がつながったと思われる(Fig.3)。得られた BC ゲルの寒天の溶解除去前には不透明な球状(Fig.2(c))であるが、除去後は半透明(Fig.2(d))であった。

Fig.4 にゲル状培養液を用いて培養し沸騰水中で寒天の除去を行って得た BC ゲル、通常の空気 - 培養液界面で産生した BC ゲル、寒天単体の ATR-IR スペクトルを示す。ゲル状培養液を用いて得られた BC ゲルのスペクトルには、寒天由来による吸収が確認されず、通常の培養で得られた BC ゲルのスペクトルとほぼ同じであることから、沸騰水中で寒天が溶解したことでゲル状培養液が液化し、BC ゲル内部から除去することに成功した。

得られた中空球状 BC ゲルは、ゲル化した培養液滴のサイズとほぼ同じであるため、ゲル状培養液滴の粒径制御によって、中空球状 BC ゲルの粒径も制御可能であることが示唆された。また、今までの方法で調製した中空球状 BC ゲル^[2](Fig.5(a))と比較すると、膜厚が不均一で薄いため強度が低下しただけではなく、ゲル状培養液を用いて調製した中空球状 BC ゲルを紙などの吸水性シート上に置くと、直ちに内部に留まっている水が吸い出されることでゲルが潰れてしまい、球体を維持することができなかった。これは母液に浸けた時間が 10 分程度と短く、ゲル状培養液に付着した酢酸菌数が少ないことやゲル化した培養液が酢酸菌の代謝を抑制したため、膜厚の薄いもしくはセルロース繊維密度の低い中空球状 BC ゲルを形成したためと考えられる。

以上の結果より、ゲル状培養液を用いて培養を行っても中空球状 BC ゲルの調製が可能であったが、中空球状 BC ゲルが数珠状につながりやすく、強度が低下した。しかし、ゲル状培養液を用いることで、1 度の培養で調製できる数を多くすることに成功し、培養液滴を用いた場合と比較し、効率よく大量の中空球状 BC ゲルの調製が期待される。

4. 参考文献

[1] Yang Hu, Jeffrey M.Catchmark, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 1727-1734
 [2] Yuka Kakinuma, Toru Hoshi, Toshiki Hagiwara, Takashi Sawaguchi, Shoichiro Yano, *Polym. Prepr. Jap.*, 2013, **62**, 4632
 [3] Jin Gu, Jeffrey M.Catchmark, *Carbohydrate Polymers*, 2012, **88**, 547-557

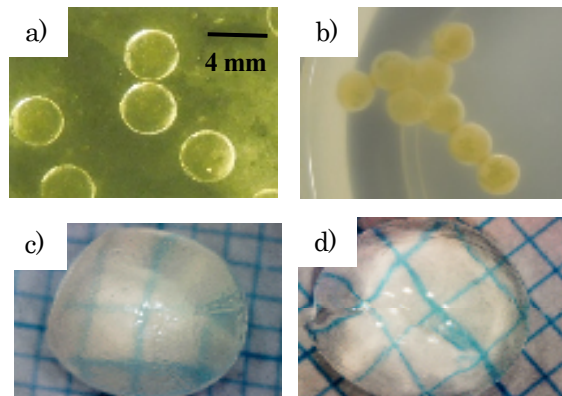


Fig.2 Images of BC hollow spherical gel by static culture (7days) in silicone oil using gelatinous culture media. a) Gelatinous culture media, b) Beaded BC gel c) After cleaning, d) After boiling water process.

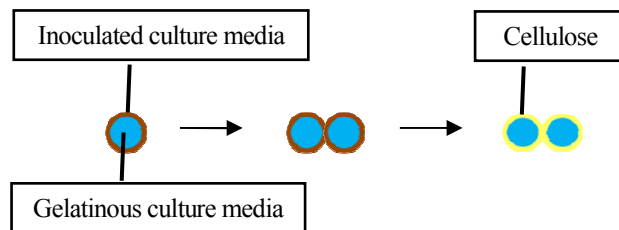


Fig.3 The formation of bead like BC gel.

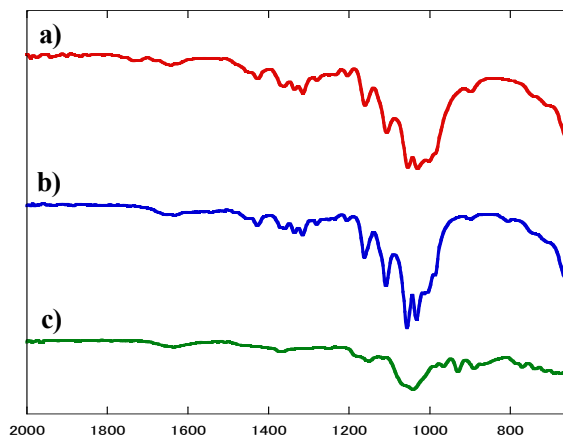


Fig.4 ATR-FTIR spectra of a) BC gels using gelatinous culture media, b) usually cultural BC gels, c) agarose.

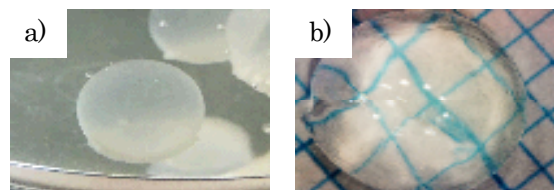


Fig.5 Images of BC hollow spherical gels. a) Droplet culture media, b) Gelatinous culture media