

# 農業用土壌改良を指向した 有用微生物内包アルギン酸ゲルビーズの開発

武井 孝行<sup>1</sup>、吉田 昌弘<sup>2</sup>、幡手 泰雄<sup>2</sup>、塩盛 弘一郎<sup>3</sup>、清山 史朗<sup>4</sup>

キーワード

土壌改良材、乳酸菌、アルギン酸ビーズ、water-in-oil emulsion

要旨

微生物資材としての乳酸菌包括アルギン酸-カルシウム (Ca-Alg) ゲルビーズをエマルジョン法を用いて調製した。水相として乳酸菌を懸濁させたアルギン酸ナトリウム (Na-Alg) 水溶液 (W1) および塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>) 水溶液 (W2) を用いた。また、油相として span 80 を溶解させた菜種油 (O) を使用した。攪拌により O 中に W1 および W2 を分散させ、それぞれの液滴を衝突せしめることで乳酸菌包括 Ca-Alg ゲルビーズを調製した。W1 中の Na-Alg 濃度、W2 中の CaCl<sub>2</sub> 濃度、全水相 (W1+W2) に対する W1 体積比および攪拌時間がゲルビーズ回収率、乳酸菌内包効率およびビーズ径に及ぼす影響を調査した。

## 1. 緒言

近年、化学農薬や化学肥料の過用や誤用に伴った農業用土壌および水質汚染が問題となっている。そこで現在、これらに代わる土壌改良材とし

て微生物資材が注目を集めている<sup>1)</sup>。これは、乳酸菌や酵母などの微生物により土壌中の微生物相をコントロールし、肥沃な土壌を形成させることを意図したものである。しかしながら、全ての土壌において長期的に安定した土壌改良効果が得られているわけではない。この理由として、これまでの微生物資材では施用した微生物が直接外部環境にさらされるため、環境の変化によって容易にそれらが死滅または低活性化されてしまうことが挙げられる<sup>2)</sup>。このような問題点を解決するためには、微生物を保護し、その働きが最大限に発揮できる場を提供する必要がある。生分解性高分子からなる担体中への微生物の固定化はこの点で非常に有効な方法である<sup>3)</sup>。

微生物資材としての微生物固定化ポリマー担

著者連絡先

1 九州大学大学院工学研究院化学工学部門、〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744,

E-mail: takei@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

2 鹿児島大学工学部応用化学工学科、〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40, E-mail: myoshida@cen.kagoshima-u.ac.jp

3 宮崎大学工学部物質環境化学科、〒890-0065 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1,

E-mail: shiomori@cc.miyazaki-u.ac.jp

4 都城工業高等専門学校物質工学科、〒885-8567 宮崎県都城市吉尾町 473-1, E-mail: shiroh@miyakonojo-nct.ac.jp

体として最も広く使用されているのがアルギン酸-カルシウム (Ca-Alg) ゲルビーズである<sup>4-8)</sup>。この理由として、微生物に対して傷害を与えない穏和な条件下でゲル形成を行えることが挙げられる。一般的に微生物包括 Ca-Alg ゲルビーズは、微生物を懸濁させたアルギン酸ナトリウム (Na-Alg) 水溶液を、ゲル化剤である  $\text{Ca}^{2+}$  を含んだ水溶液内に滴下するという方法により作製される<sup>9)</sup>。しかし、この手法は微生物固定化ゲルビーズの大量生産には不向きであり、これが本微生物資材の商品化への大きな障害となっている。

本研究ではエマルション法を利用した乳酸菌内包 Ca-Alg ゲルビーズの調製を目的とする。具体的には、油相中に微生物を含む Na-Alg 水溶液および塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ) 水溶液を分散させ、それら液滴の衝突によりゲルビーズを形成させる (図 1)。本手法では既存の手法よりも簡便な装置で大量にゲルビーズを調製することができる。本稿では、ゲルビーズ調製条件がビーズ回収率、乳酸菌内包効率等に及ぼす影響を調査したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 用いた試薬および乳酸菌

Na-Alg (80~120 mPa·s) および  $\text{CaCl}_2$  は和光純薬より購入した。乳酸菌 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, NBRC 13953 株) は製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門より購入した。乳酸菌の培養には 803 培地 (ポリペプトン 5 g/L、酵母エキス 5 g/L、グルコース 5 g/L、ラクトース 2 g/L、Tween 80 0.5 g/L、硫酸マグネシウム 7 水和物 1 g/L、pH 6.5-7.0) を使用し、対数増殖期にある乳酸菌を実験に用いた。

### 2.2 乳酸菌包括 Ca-Alg ゲルビーズの調製

Ca-Alg ゲルビーズの調製には攪拌翼を備えたガラス製セパラブルフラスコを使用した (図 2)。乳酸菌を含む 803 培地 (約  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml) に Na-Alg を溶解させたものを内水相 1 (W1)、 $\text{CaCl}_2$  水溶液を内水相 2 (W2) とした。また、菜種油に span 80 (0.5% (w/w)) を添加したものを油相 (O) とした。O 200ml をセパラブルフラスコに添加後、攪拌下において W1 を添加し、エマルションの安定化のために 30 分間放置した。続いて、18G の注射針を装着したシリンジを用いて W2 を W1/O エマルション中に滴下し (10 ml/min)、任意の時間攪拌を続けた後、濾過によってゲルビーズを回収した。ゲルビーズ調製は 22°C にて行った。

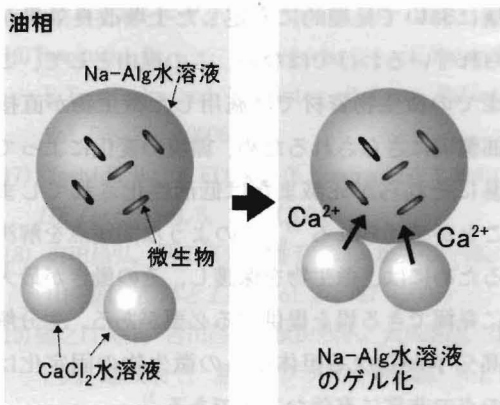


図 1 乳酸菌包括 Ca-Alg ゲルビーズ形成機構。

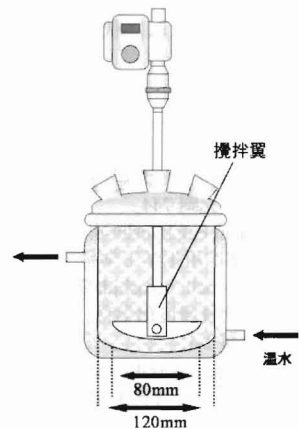


図 2 ゲルビーズ調製装置。

## 2.3 ゲルビーズ回収率の算出

真空乾燥機を用いて調製したゲルビーズを乾燥した。回収率は以下の式より算出した。

ゲルビーズ回収率 (%) =

$$\frac{(\text{乾燥ゲルビーズ重量} - \text{ビーズ中の CaCl}_2 \text{重量}) \times 100}{\text{仕込みの Na-Alg 重量}}$$

仕込みの Na-Alg 重量

## 2.4 乳酸菌内包効率の算出

調製したゲルビーズ 1 g を 55 mM クエン酸三ナトリウムを含む生理食塩水 (0.85% (w/v) NaCl) 50 ml 中に添加し、37°C で 30 分間振盪することでビーズを完全に溶解した。続いて、その水溶液中に含まれる乳酸菌の生菌数を寒天培地を用いたコロニーカウント法により測定した。乳酸菌内包効率は以下の式より算出した。

乳酸菌内包効率 (%) =

$$\frac{\text{ゲルビーズ内に包括された乳酸菌の生菌数} \times 100}{\text{仕込みの乳酸菌の生菌数}}$$

仕込みの乳酸菌の生菌数

## 3. 結果及び考察

### 3.1 CaCl<sub>2</sub>濃度がゲルビーズ回収率および菌内包効率に及ぼす影響

本ゲルビーズ調製法において Na-Alg 水溶液 (W1) 液滴は CaCl<sub>2</sub> 水溶液 (W2) 液滴中の Ca<sup>2+</sup> を取り込むことでゲル化する。従って、W2 中の CaCl<sub>2</sub> 濃度が低すぎればゲルビーズを形成させることはできない。一方、その濃度が高すぎれば浸透圧差により W1 中の乳酸菌に傷害を与えてしまう。そこで、本検討では水相中の CaCl<sub>2</sub> 濃度がゲルビーズ回収率および乳酸菌内包効率に及ぼす影響を調査した。ゲルビーズ調製条件を表 1 に示す。全水相 (W1 + W2) 中の CaCl<sub>2</sub> 濃度が 1.1% (w/v) から 10.0% (w/v) となるように W2 中の CaCl<sub>2</sub> 濃度を 3.3% (w/v) から 30.0% (w/v) まで変化させた。図 3 に全水相中の CaCl<sub>2</sub> 濃度とゲルビーズ回収率お

表 1 3.1 節でのゲルビーズ調製条件.

W1 体積	100 ml
W2 体積	50 ml
W1中のNa-Alg濃度	2.0% (w/v)
全水相(W1+W2)中のCaCl <sub>2</sub> 濃度	1.1% (w/v), 3.3%, 5.0%, 10.0%
攪拌速度	100 rpm
攪拌時間	3 時間

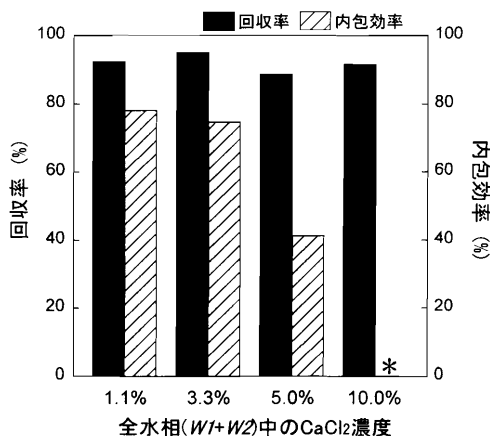


図 3 全水相中の CaCl<sub>2</sub> 濃度とゲルビーズ回収率および乳酸菌内包効率との関係。\*) 内包効率 < 0.1%.

よび内包効率との関係を示す。回収率はいずれの CaCl<sub>2</sub> 濃度でも 90% とほぼ一定であり、水相中の CaCl<sub>2</sub> 濃度が 1.1% の条件においてもゲルビーズの形成が可能であった。一方、乳酸菌内包効率に関しては、CaCl<sub>2</sub> 濃度 1.1% および 3.3% において 75%-80% 程度であったが、CaCl<sub>2</sub> 濃度の上昇に伴ってその値は減少した。これは菌体内外での浸透圧差により菌が傷害を受けたためであると考えられる。そこで次の検討では、全水相中の CaCl<sub>2</sub> 濃度を 1.1% および 3.3% とした。

### 3.2 全水相に対する W1 の体積比がゲルビーズ回収率および菌内包効率に及ぼす影響

本手法においてゲルビーズを大量に生産するためには、W1 の体積を増加させることが有効で

表2 3.2節でのゲルビーズ調製条件.

全水相(W1+W2)体積	150 ml
W1中のNa-Alg濃度	2.0% (w/v)
全水相に対するW1の体積比 [W1/(W1+W2)]	0.53, 0.67, 0.80, 0.93
全水相(W1+W2)中のCaCl <sub>2</sub> 濃度	1.1% (w/v), 3.3%
攪拌速度	100 rpm
攪拌時間	3 時間

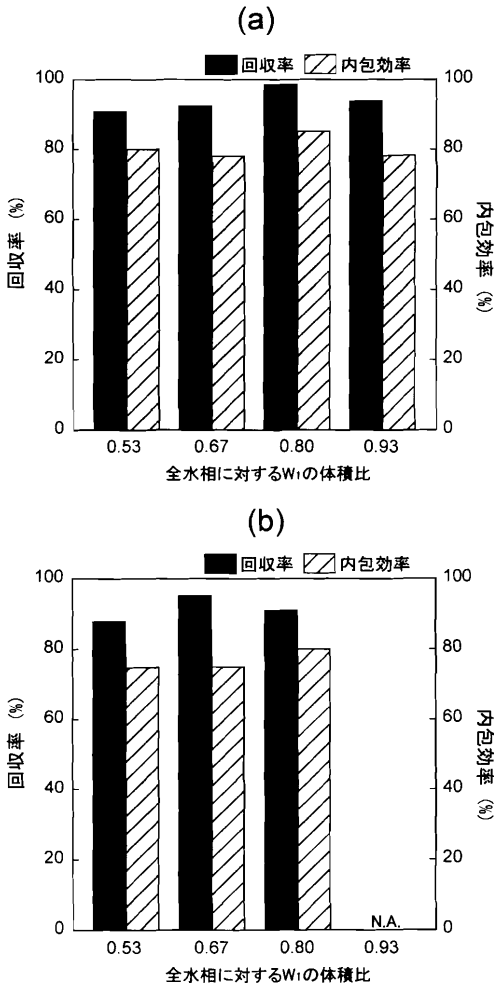


図4 全水相に対する W1 の体積比とゲルビーズ回収率および乳酸菌内包効率との関係. 全水相中の CaCl<sub>2</sub>濃度は 1.1% (w/v) (a)および 3.3% (b). N. A.) ゲルビーズが凝集.

ある。そこで、全水相に対する W1 の体積比 ( $W1/(W1+W2)$ ) がゲルビーズ回収率および乳酸菌内包効率に及ぼす影響を調査した。表2にゲルビーズ調製条件を示す。全水相中の CaCl<sub>2</sub>濃度を 1.1% (w/v)および 3.3%とし、体積比 ( $W1/(W1+W2)$ ) を 0.53 から 0.93 まで変化させた。図4に各条件におけるゲルビーズ回収率および乳酸菌内包効率を示す。水相中の CaCl<sub>2</sub>濃度が 1.1% (w/v)の場合、回収率および菌内包効率はそれぞれ約 90%および約 80%程度であり、条件による違いはほとんどなかった。CaCl<sub>2</sub>濃度が 3.3% (w/v)の場合も同様に条件間における違いはほとんど観察されなかったが、体積比 0.93 の条件ではゲルビーズが凝集した。本ゲルビーズ調製法では、W1/O エマルション中に滴下した W2 (液滴径: 数 mm) が O 中で微小な液滴 (数十 μm ~ 数百 μm) となり、この W2液滴と W1液滴とが衝突することにより W1 が徐々にゲル化することで Na-Alg ゲルビーズ得られる。ゲルビーズが凝集した条件での W2 中の CaCl<sub>2</sub>濃度は 50% (w/v)と全ての条件の中で最も高く、これにより滴下した W2 が O 中で微小な液滴になる前にその周囲で W1 液滴のゲル化が急速に起こることで、ビーズが凝集したと考えられる。以下の検討では全水相中の CaCl<sub>2</sub>濃度および W1 の体積比をそれぞれ 1.1% (w/v)、0.93 とした。

### 3.3 攪拌時間がゲルビーズ回収率および菌内包効率に及ぼす影響

本検討では、W1 液滴のゲル化に必要な攪拌時間を調査した。表3に実験条件を示す。W2 添加後の攪拌時間は 0.5 時間から 6 時間とした。図5に攪拌時間とゲルビーズ回収率および菌内包効率との関係を示す。全ての条件で回収率および菌内包効率はほとんど同じであり、攪拌時間は 0.5 - 1 時間で十分であることが示された。以下の検討では W2 添加後の攪拌時間を 1 時間とした。

表 3 3.3 節でのカプセル調製条件.

W1 体積	140 ml
W2 体積	10 ml
W1中のNa-Alg濃度	2.0% (w/v)
全水相(W1+W2)中のCaCl <sub>2</sub> 濃度	1.1% (w/v)
攪拌速度	100 rpm
攪拌時間	0.5, 1, 3, 6 時間

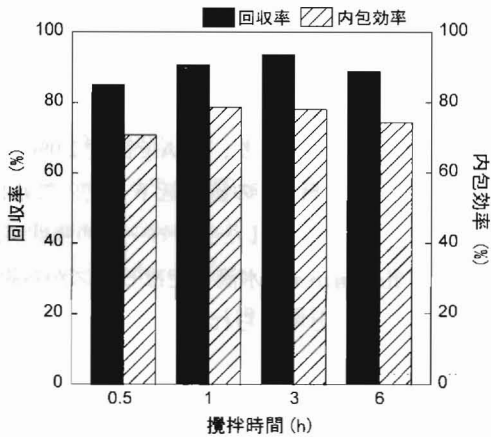


図 5 攪拌時間とゲルビーズ回収率および乳酸菌内包効率との関係.

表 4 3.4 節でのゲルビーズ調製条件.

W1 体積	140 ml
W2 体積	10 ml
W1中のNa-Alg濃度	1.0% (w/v), 2.0%
全水相(W1+W2)中のCaCl <sub>2</sub> 濃度	1.1% (w/v)
攪拌速度	70, 100, 150, 200 rpm
攪拌時間	1 時間

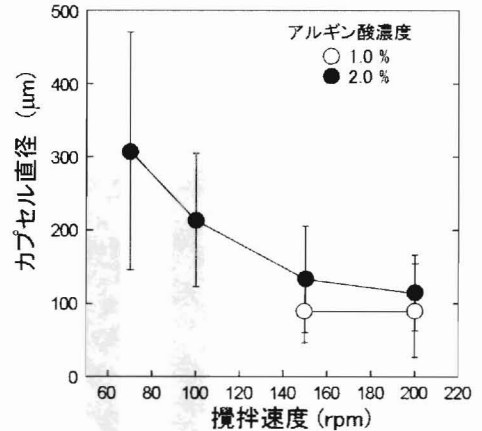


図 6 攪拌速度、Na-Alg 濃度とビーズ径との関係.

### 3.4 Na-Alg 濃度および攪拌速度がゲルビーズ径、回収率および菌内包効率に及ぼす影響

本研究のゲルビーズ型微生物資材は、土壌に施用後、ビーズの分解とともに徐々に微生物を放出できるため、非包括微生物と比べてより効率的に微生物を土壌中に定着させることができる。ゲルビーズの分解速度はそのポリマー濃度およびビーズ径に依存する。従って、本検討では W1 中の Na-Alg 濃度、攪拌速度がビーズ径、回収率および菌内包効率に及ぼす影響を調査した。表 4 に実験条件を示す。W1 中の Na-Alg 濃度は 1.0% (w/v) および 2.0% (w/v) とした。また、攪拌速度は 70 rpm から 200 rpm とした。図 6 に攪拌速度とビーズ径

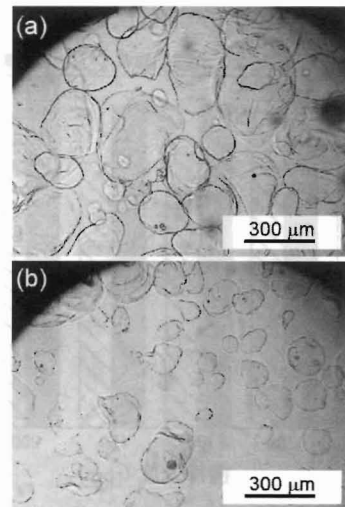


図 7 攪拌速度 100 rpm (a) および 200 rpm (b) で調製したゲルビーズの写真。Na-Alg 濃度は 2.0% (w/v)。

との関係を示す。Na-Alg 濃度 2.0% (w/v)の場合、攪拌速度 70 rpm においてビーズ径は  $309 \pm 163 \mu\text{m}$  であった。攪拌速度が増加するにつれてビーズ径は減少し、攪拌速度 200 rpm の条件においてその径は  $116 \pm 52 \mu\text{m}$  であった (図 7)。一方、Na-Alg 濃度 1.0% (w/v) の場合、攪拌速度 70 rpm および 100 rpm の条件においては、ゲルビーズを形成するこ

とができなかった。これは、*O* と *WI* との密度差が大きく、*WI* を *O* 中にうまく分散できなかったためであると考えられる。また、攪拌速度 150 rpm および 200 rpm の条件では、Na-Alg 濃度 2.0% (w/v) の場合と比較して大きな違いはなかった。

図 8 に各攪拌速度、Na-Alg 濃度とゲルビーズ回収率および菌内包効率との関係を示す。Na-Alg 濃度 2.0% (w/v) の場合には攪拌速度によらず回収率および菌内包効率はそれぞれ約 90% および 80% であった。一方、Na-Alg 濃度 1.0% (w/v) の場合には、ゲルビーズ回収率および菌内包効率はそれぞれ約 80% および 50% であり、Na-Alg 濃度 2.0% (w/v) の場合と比べてそれらの値は低下した。これは、*WI* の粘度および形成したゲルビーズの強度が低いために乳酸菌が *WI* 水滴またはビーズから脱離したためであると考えられる。

#### 4. 結言

エマルション法を用いて乳酸菌包括アルギン酸-カルシウムゲルビーズを調製した。乳酸菌を懸濁させた Na-Alg 水溶液および  $\text{CaCl}_2$  濃度水溶液を水相として用いた。また、油相として span 80 を溶解させた菜種油を使用した。本手法を用いることで直径 100 ~ 300  $\mu\text{m}$  の乳酸菌包括ゲルビーズを調製することができた。また、ゲルビーズ回収率および菌内包効率はそれぞれ約 90% および 80% であった。

#### 参考文献

- 1) Young C.C., P.D. Rekha, W.A. Lai and A.B. Arun, "Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid", *Biotechnol Bioeng*, **95**, 76-83 (2006)
- 2) Vanelsas J.D., J.T. Trevors, D. Jain, A.C. Wolters, C.E. Heijnen and L.S. Vanoverbeek,

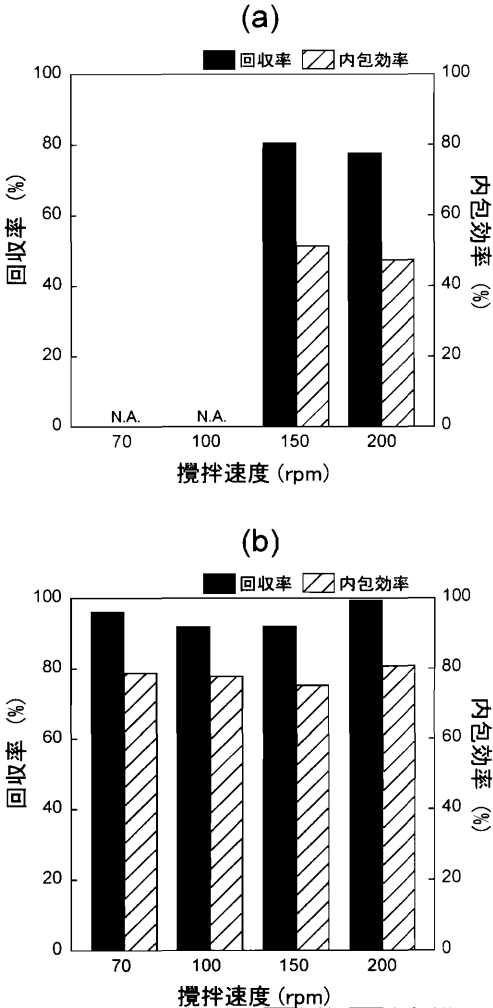


図 8 攪拌速度、Na-Alg 濃度とゲルビーズ回収率および乳酸菌内包効率との関係。(a) Na-Alg 濃度 1.0% (w/v), (b) Na-Alg 濃度 2.0%. N.A.) ゲルビーズの調製不可。

- "Survival of, and root colonization by, alginate-encapsulated pseudomonas-fluorescens cells following introduction into soil", *Biol Fertil Soils*, **14**, 14-22 (1992)
- 3) Takei T., M. Yoshida, Y. Hatate, K. Shiomori and S. Kiyoyama, "Lactic acid bacteria-enclosing poly(?-caprolactone) microcapsules as soil bio-amendment", *J Biosci Bioeng*, *in press*
  - 4) Stormo K.E. and R.L. Crawford, "Preparation of encapsulated microbial-cells for environmental applications", *Appl Environ Microbiol*, **58**, 727-730 (1992)
  - 5) Trevors J.T., "Respiratory activity of alginate-encapsulated pseudomonas-fluorescens cells introduced into soil", *Appl Microbiol Biotechnol*, **35**, 416-419 (1991)
  - 6) Qi W.T., W.T. Yu, Y.B. Xie and X.J. Ma, "Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture in alginate-chitosan-alginate microcapsule", *Biochem Eng J*, **25**, 151-157 (2005)
  - 7) Wang G.J., L.Y. Chu, W.M. Chen and M.Y. Zhou, "A porous microcapsule membrane with straight pores for the immobilization of microbial cells", *J Membr Sci*, **252**, 279-284 (2005)
  - 8) Chen Y.M., T.F. Lin, C. Huang, J.C. Lin and F.M. Hsieh, "Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*", *J Hazard Mater*, **148**, 660-670 (2007)
  - 9) Park J.K. and H.N. Chang, "Microencapsulation of microbial cells", *Biotechnol Adv*, **18**, 303-319 (2000)