

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21656200

研究課題名（和文）：土壌微生物相を好転制御する環境指向型カプセル化微生物製剤の創製

研究課題名（英文）：Preparation of environment-friendly microcapsule improved soil microorganism phase

研究代表者：愛甲 涼子 (AIKOU RYOUKO)

鹿兒島大学・理工学研究科（工学系）・教務職員

研究者番号：50244265

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）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定量的に行った。

研究成果の概要（英文）：

Useful microorganisms (lactic acid bacteria) were immobilized in biodegradable microcapsule utilizing the solvent evaporation technique of solid-in-oil-in-water (s/o/w) emulsions. Considering factors which influence microcapsule form and microorganism content, we performed the optimization of preparation conditions of the microcapsule immobilized useful microorganisms by changing the preparation conditions. As a result, the optimized microcapsule was efficiently able to immobilize microorganism, and obtained high activity. The microcapsule will be applied to soil improvement as a soil conditioner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	0	1,900,000
2010年度	700,000	0	700,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,200,000	180,000	3,380,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：有用微生物、乳酸菌、土壌改良、マイクロカプセル、環境分解ポリマー、S/O/W エマルション、固定化微生物

1. 研究開始当初の背景

農薬は、便利さ故に農作物に対する過用や誤用で土壤環境を悪化（腐敗型土壌：フザリウム等の糸状菌が多発しやすく、無機養分が不溶化した状態）させている。持続可能な農業を行うためには、自然の理にかなった新しい農業技術が必要である。そこで、農薬に変わる土壌改良材として注目を集めているのが微生物資材を使った土壤環境の微生物相コントロールである。これは、土壌に対し有効な有用微生物（乳酸菌、酵母菌など）を有機物とともに共存させ土中の微生物相を直接管理し、発酵型の肥沃な土壌（発酵型土壌；乳酸菌や酵母などを主体とする発酵系の微生物が優占している土壌）を形成させることを意図している。近年、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、生産者の間で注目を集めている資材である。現在、微生物資材による効果が様々な場所で報告されており、例えば、キュウリを一作つくると、キュウリの好む三要素や微量元素が吸われて土壌養分が消耗し、バランスも崩れ、それが元に戻るのに約 10 年かかるといわれているが、微生物資材を施用することで複数年に渡りキュウリを年 2 連作にて作り続け、連鎖障害が見られないケースもある。このように微生物資材は効果が抜群で、自然にやさしい資材として推奨されているが、全ての土地においてこのように安定した効果を得られていないのが現状である。様々な土地環境に対し微生物の力が最大限に働くのは難しく、微生物の働き及び自然力を完全に活かしてきていない。さらに、微生物を取り扱ったことのない生産者にとって、1) 微生物は病原菌？、2) 危険なもの？、3) よく分からないもの=なんとなく怖い！！、4) 効果への疑問？などの不

安からこれらを受け入れ難く、たとえ利用しても微生物についての認識不足からうまく管理できない。そこで、問題を解決するためには、土壌中で微生物の働きが最大限に発揮できる環境を作るために外部環境に影響されずに微生物が活動できる場が必要である。また、生産者に対し客観的科学的なデータの裏付けによる安全性と効果の確認をし、生産者らとの密接な情報交換から不安を払拭する必要がある。

2. 研究の目的

上記に記載した有用微生物の効果を最大限発揮させるため、有用微生物を生分解性マイクロカプセルに内包させ外部環境に影響されず安定した効果が発揮できる農薬に代わる新しい土壌改良資材の開発を目的とする。有用微生物がカプセル内部に包括固定することにより、カプセル内部という嫌氣的反応場により微生物が効果的に生存し続けることができることもマイクロカプセル化の特色の一つとなる。本研究課題では、新しい土壌改良資材として土壤環境の改善に適用可能な有用微生物を包括固定化するマイクロカプセルの調製条件の最適化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を定量的に評価した。

3. 研究の方法

(1) 乳酸菌を内包するMCの調製

本研究では有用微生物として *Lactobacillus bulgaricus* NBRC13953 株 0.2g-wet を、アルギン酸ナトリウム 1%(w/v) からなる内水相 2.5ml に混合する。さらに、その混合液をポリεカプロラクトン 5%(w/v)、ソルビタンモノオレエート 3% (w/v)、ジクロロメタン 92% (w/v) からなる有機相 25ml と

マグネチックスターラーで攪拌し w/o エマルションを形成する。その w/o エマルションを攪拌下 (100rpm) にてポリビニルアルコール 1%(w/v)、第三リン酸カルシウム 10%スラリー30%(w/v)からなる外水相 440ml に混合し、w/o/w エマルションを形成する。さらに減圧下 (700 hPa) で液中乾燥を行い、ポリマーを固化し、乳酸菌内包MCを回収した。図1に調製スキームの概要を示す。

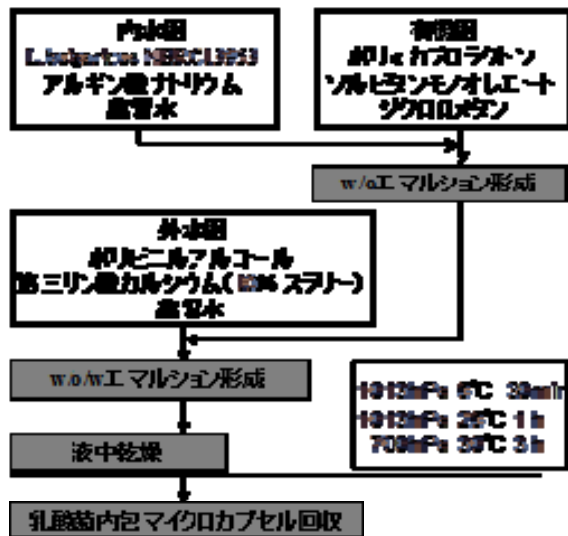


図1 有用微生物マイクロカプセルの調製スキーム

(2) 糖代謝量を指標とした乳酸菌内包マイクロカプセルの活性評価による調製条件の最適化

乳酸菌内包 MC 1g を 803 培地 100ml に入れ嫌気条件下で静置培養することで糖を代謝させ、ガスクロマトグラフィーにてその転化量を経時的に定量した。糖の転化量をMC内乳酸菌の活性とし、3つの因子 (w/o 体積比率、アルギン酸ナトリウム濃度、ポリマー分子量) を考慮して調製条件を順次変化させることで乳酸菌内包MC調製条件の最適化を行った。

(3) 調製したマイクロカプセルの微生物

活性向上

最適化した乳酸菌内包マイクロカプセルの更なる活性向上を目指して調製前の添加乳酸菌数の増加及びマイクロカプセル調製後のマイクロカプセル内菌体培養による活性向上への効果を実験した。

(4) 微生物資材と乳酸菌内包マイクロカプセルの微生物活性の比較

上記活性評価法において重量基準で乳酸菌内包マイクロカプセルと微生物資材との最大活性を相対評価した。また、活性向上操作後の結果とも比較検討した。

4. 研究成果

(1) 乳酸菌を内包するマイクロカプセルの調製

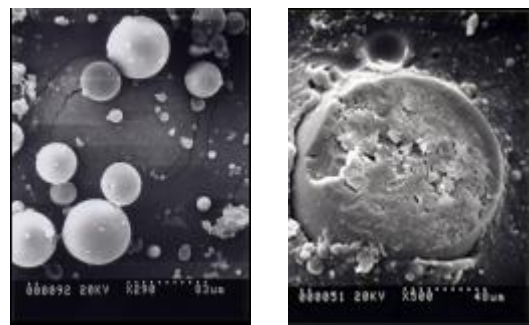


図2 乳酸菌内包マイクロカプセルのSEM写真 (左: 外観、右: 断面)

マイクロカプセルの内部構造はマトリックス型で粒径が 50~200 μm である (図2)。このようなマトリックス型の構造を有することで乳酸菌の固定化密度を増し、積極的な嫌氣的反応場の利用が可能である。

(2) 乳酸菌内包マイクロカプセルの調製条件の最適化

図3、4、5にカプセル形成に影響する3つの因子 (w/o 体積比率、アルギン酸ナトリウム濃度、ポリマー分子量) を考慮し、

調製条件の最適化を行った結果を示す。

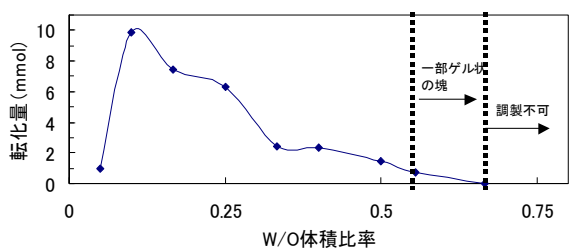


図3 乳酸菌内包マイクロカプセルの活性評価 (w/o 体積比)

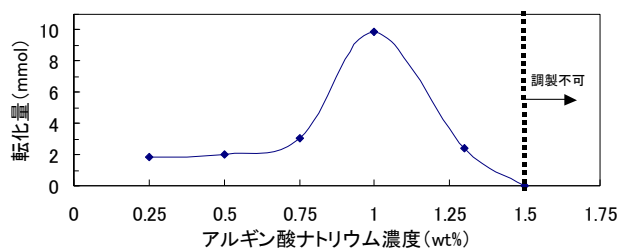


図4 乳酸菌内包マイクロカプセル活性評価 (Alg-Na 濃度)

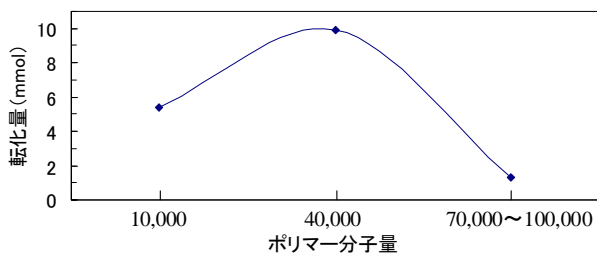


図5 乳酸菌内包マイクロカプセルの活性評価 (ポリマー分子量)

上図のように w/o 体積比、内水相のアルギン酸ナトリウム濃度、ポリマー分子量を順次最適化することで、最も活性の高い乳酸菌内包MC調製条件はそれぞれ 1 : 10、1%、40,000 であることが分かった。これよりカプセルの形状および性質 (活性) には液滴の安定性、内水相および有機相の粘度が強く影響すると分かった。

(3) 調製したマイクロカプセルの微生物活性向上

図6に最適化した乳酸菌内包マイクロカプセルと活性向上のための培養操作を行っ

たマイクロカプセル (0.3g-wet 添加、調製後マイクロカプセル内菌体を培地中で増殖) との転化量比較を示す。

(4) 市販の微生物資材と乳酸菌内包マイクロカプセルの活性比較

図6に微生物資材と最適化した乳酸菌内包マイクロカプセルとの転化量比較を示す。

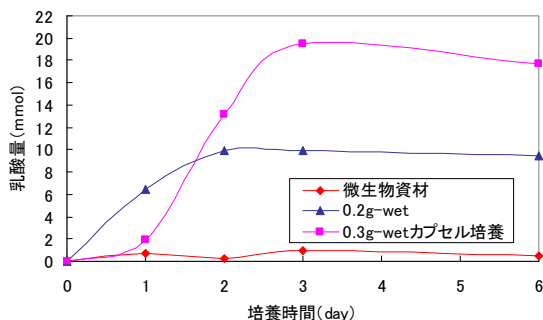


図6 市販の微生物資材と乳酸菌内包マイクロカプセルとの糖の乳酸への転化量比較

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① T.Takei, K.Ikeda, H.Ijima, K.Kawakami, M.Yoshida, Y.Hatate, Preparation of Polymeric microcapsules enclosing microbial cells by radical suspension polymerization via water-in-oil-in water emulsion, Polymer Bulletin, 査読有, Vol.63, No.3, 2010, pp.283-291
- ② M.Yoshida, K.Shiki, I.akakura, Y.Hatate, K.Shiomori, S.Kiyoyama, T.Takei, Biodegradable Microcapsule Immobilized Lactic Acid Bacteria and its soil bio-amendment application, Proceedings of 17th International Symposium on Microencapsulation, 査読有, 2009, p123
- ③ T.Takei, M.Yoshida, Y.Hatate, K.Shiomori, S.Kiyoyama, Preparation of lactic acid bacteria-enclosing alginate beads: effect of preparation parameter in emulsion system on bead characteristics, Polymer Bulletin, 査読有, Vol.63, No.4, 2009, pp.599-607

[学会発表] (計4件)

- ① N. Iki, M. Yoshida, R. Aiko, Y. Ozuno, K. Shiomori, S. Kiyoyama, Evaluation and characteristics of microspheres immobilized *Bacillus subtilis*, The 24th International Symposium on Chemical Engineering, 2011年12月3日 (Hyundai Hotel, Gyeong-ju, Korea)
- ② 伊喜憲明、吉田昌弘、大角義浩、愛甲涼子、塩盛弘一郎、清山史朗、*Bacillus subtilis* を内包するマイクロスフェアの開発とその物性評価について、第22回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会, No. 46, 2011年7月22日(鹿児島県霧島市(ホテル霧島キャッスル))
- ③ K. Tanabe, M. Yoshida, R. Aiko, Y. Ohzuno, C. Hatanaka, Denitrification rate of cross-linked polyvinyl alcohol gel-microsphere immobilized *Paracoccus denitrificans* NBRC13301, The 23th International Symposium on Chemical Engineering, OD-05, 2010年12月4日(九州産業大学(福岡市))
- ④ 高倉一旗、吉田昌弘、幡手泰雄、塩盛弘一郎、清山史朗、武井孝行、ポリ-ε-カプロラク톤を骨格とするカプセル化乳酸菌製剤の調製及び発酵特性、化学工学会第41回秋季大会, 2009年9月17日(広島大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

愛甲 涼子 (AIKO RYOKO)

鹿児島大学・理工学研究科・教務職員

研究者番号 : 50244265

(2) 研究分担者

吉田 昌弘 (YOSHIDA MASAHIRO)

鹿児島大学・理工学研究科(工学系)・教授

研究者番号 : 50315397