

カプセル化したサッチ分解菌の糖類添加による活性維持の効果

服巻 晃志 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, k4647786@kadai.jp)
 大角 義浩 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, ohzuno@cen.kagoshima-u.ac.jp)
 清山 史朗 (都城工業高等専門学校 物質工学科, shiroh@miyakonojo-nct.ac.jp)
 塩盛 弘一郎 (宮崎大学 物質環境化学科, shiomori@cc.miyazaki-u.ac.jp)
 幡手 泰雄 (MC ラボ株式会社, mc-labo@nifty.com)
 武井 孝行 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, takei@cen.kagoshima-u.ac.jp)
 吉田 昌弘 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, myoshida@cen.kagoshima-u.ac.jp)

Effect of maintaining activity by addition of sugars for microencapsulated thatch-degrading microorganism

Kouji Haramaki (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)
 Yoshihiro Ohzuno (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)
 Shiro Kiyoyama (Department of Materials Engineering, National Institute of Technology Miyakonojo College, Japan)
 Koichiro Shiomori (Department of Material Environmental Chemistry, Miyazaki University, Japan)
 Yasuo Hatate (MC-Labo Co., Ltd., Japan)
 Takayuki Takei (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)
 Masahiro Yoshida (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

要約

芝生は、家庭や公園のような身近な場所からゴルフ場などの広域なものまで、様々な場所で利用されている。芝生が生育する場所では、管理のために定期的に芝刈りを行う必要がある。芝刈りで発生する刈かすは、堆積してサッチ層となり、芝の目詰まりや病原菌の温床となることから、芝に様々な障害を引き起こす。そこで本研究では、微生物（サッチ分解菌）の分解能力に着目し、カプセル化することでサッチ層の除去効果を持続させるための基礎的検討を目的としている。具体的には、サッチ分解菌の選定およびアルギン酸カルシウムを壁材としたサッチ分解菌内包カプセルの調製を行い、さらに糖類溶液（グルコース、スクロース、トレハロース）による保護剤処理によって、サッチ分解菌の長期安定化を試みた。候補となる複数のサッチ分解菌でセルロースの分解試験を行った結果、*Bacillus pumilus* NBRC12092を選択した。保護剤処理をカプセルに対して行うことで、カプセル内の分解菌を乾燥処理による負荷から保護することができた。保存安定性試験では、カプセルの形状を崩壊することなく保ち続け、0.2 mol/Lスクロース水溶液を用いた保護剤処理を行うことで、21日経過した後もカプセル中で約108 CFU/gと高い生菌数を保持していた。さらに、サッチの主要成分であるセルロースの分解能力も維持していた。

Abstract

The mowed lawn grass generated by lawn mowing accumulates as a thatch layer. The thatch layer clogging the turf and providing a hotbed for pathogens causes various obstacles toward the turf. The purpose of this study is to reduce the volume of thatch (main component: cellulose) at a low cost by utilizing thatch-degradation bacterium in the world of nature. We prepared capsules containing thatch-degradation bacterium using calcium alginate as a wall material, and soaked them with a sugar solution such as glucose, sucrose or trehalose as a protective agent for long-term stability. *Bacillus pumilus* NBRC12092 was selected from the results of cellulose degradation tests. In addition, by applying the protective agent treatment to the capsule, the microorganisms in the capsule could be protected from the load due to the drying treatment. A high decomposition activity for the decomposition of cellulose was maintained even after 21 days in the storage assay and cell population was approximately maintained 108 cells/g. The ability was effectively improved by the addition of the protective agent.

キーワード

サッチ分解菌, 微生物, カプセル化, 保護剤, アルギン酸ビーズ

1. はじめに

芝地は、家庭や公園のような身近な場所からゴルフ場などの広域なものまで、様々な場所で利用されている。芝生が生育する場所では、管理のために定期的に芝刈りを行う必要がある。その際に発生する刈かすは、放置すると土壌表面に堆

積し、サッチ層を形成する。このサッチは芝草の枯れた葉や、茎、根からなる有機物の堆積層を指すが、繊維質であることから、空気や水分、農薬や肥料の透過を不良にし、芝生の生育不良や土壌環境の悪化を引き起こす（江原, 1984）。以上より、芝生の管理には、サッチの除去が必要不可欠である。従来、サッチの除去には、広域な芝地ではバーチカルモアやスーパードといった機械にて、また狭い芝生地であれば、レーキや熊手といった人の手で行われている（江原, 1984; 吉田他, 2015）。こうした、物理的な手法による除去は、労力やコ

ストがかかり、芝生を傷めることが懸念される。

近年、微生物の分解能力を活かしてサッチ層を分解除去する手法が提案されている(川端他, 2007)。サッチを分解できる菌体(サッチ分解菌)を散布するだけで、サッチの除去が可能であることから、手軽でかつ芝生や土壌に対する負荷も軽減できる。その一方で、分解菌を直接散布するだけでは、天候(日照や降雨など)や土壌環境の影響を受けやすく、除去効果が長期間安定的に働くことが求められる(吉田他, 2013)。

当研究グループでは、これまでにカプセル化技術による微生物の固定化に着目している(吉田他, 2013)。サッチ分解菌をカプセルに担持させることで、環境変化による影響から分解菌を保護しつつ、芝地に効率よく定着させることを可能にする。更に、カプセル化材料として、多糖類などの環境分解性ポリマーを用いれば、カプセル自体が食餌となって分解菌の失活を抑制できるため(吉田他, 2013)、分解効果の持続性という面でも大いに期待できる。

しかしながら、カプセル化の工程には、保存時の腐敗を防ぐために乾燥処理を行う必要があり、それが包括固定化する分解菌にとって大きなストレスとなることが報告されている(Kim et al., 2017; 根井, 1972)。さらに、乾燥時の負荷はカプセル内の分解菌の生菌数を減少させる原因となるため(Archacka et al., 2019)、それは芝地にて施用する上での、分解効果の減衰や持続性の低下をもたらすことが予想される。そのため、カプセル調製時の操作工程である凍結乾燥の負荷による活性の低下を防ぐ必要がある。

本研究では、無毒性で安価な高分子材料として一般的に利用されるアルギン酸カルシウム(Shahrulzaman and Ida, 2015; Dibyakanta et al., 2017)を壁材とするサッチ分解菌内包カプセルを調製し、これに保護剤(Kim et al., 2017)として糖類を添加した水溶液に浸漬した。

候補となるサッチ分解菌の選定を行うと共に、保護剤の有無による乾燥前後でのカプセル内の生菌数を比較することで、乾燥過程でのサッチ分解菌の活性保持が可能であるか検討し、保護剤の有無によるカプセルに内包された微生物の安定性の評価を行った。

2. 実験

2.1 試薬

Polypepton、Bacto Yeast Extract、硫酸マグネシウム七水和物、寒天(粉末)、アルギン酸ナトリウム(80~120 cp)、塩化カルシウム、グルコース、スクロース、トレハロース、クエン酸三ナトリウム、塩化ナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)、6 mol/L 塩酸、HEPESは和光純薬工業株式会社製のものを使用した。水酸化ナトリウムは関東化学株式会社製のものを使用した。

2.2 サッチ分解菌の培養

本研究では、カプセルに内包するサッチ分解菌として *Bacillus subtilis* NBRC13714 (培養時間 24 h)、*Bacillus pumilus* NBRC12092 (培養時間 36 h)、*Bacillus megaterium* NBRC15308 (培養時間 48 h)、*Cellulomonas sp.* NBRC16064 (培養時間 24 h) を選択した。これらの分解菌は凍結保存したも

のを解凍し、液体培地(702培地)の入った培養用フラスコ内に加え、バイオシェイカー(TB-12T 高崎科学器械株式会社製)にて 30 °C で 150 rpm の条件で振盪して培養した。使用した培地は、オートクレーブ(ATS-40 ALP 株式会社製)にて 121 °C で 15 min 滅菌した。

2.3 サッチ分解菌のセルロース分解試験

サッチ分解菌を培養した培地を 1 ml (約 $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml) 取り、CMC-Na を溶解した HEPES 水溶液 50 ml の入ったフラスコ内に加え、30 °C のインキュベーター(SLI-501 東京理化学器械株式会社製)内で 1 日間、150 rpm で攪拌した。分解能力を評価するために、コントロールとして分解菌を含まない無菌培地を 1 ml 加えたものを合わせて用意した。攪拌開始時と終了後の粘度を回転式粘度計(LVDV-E 英弘精機株式会社製)で測定し、減少量($\Delta\eta$)から分解力を評価した。 $\Delta\eta$ は式(1)に基づき算出した。

$$\Delta\eta = \eta_1 - \eta_2 \quad (1)$$

η_1 および η_2 は攪拌開始時と終了後の粘度(cp)である。

2.4 サッチ分解菌内包カプセルの調製

例えば、*Bacillus pumilus* NBRC12092 (図1)の培養終了後、培養液にアルギン酸ナトリウムを加え、2% (w/v) アルギン酸ナトリウム培養液を調製した。この液を 1.1% (w/v) 塩化カルシウム水溶液内にシリンジで滴下し、ゲルカプセルを調製した。ゲルカプセルはろ過、回収してから新しい 1.1% (w/v) 塩化カルシウム水溶液に移し、30 min 攪拌することでさらに硬化させた。ろ過、回収後 12 h 凍結乾燥機(FDU-1200 東京理化学器械株式会社製)で乾燥させて、カプセルを調製した。

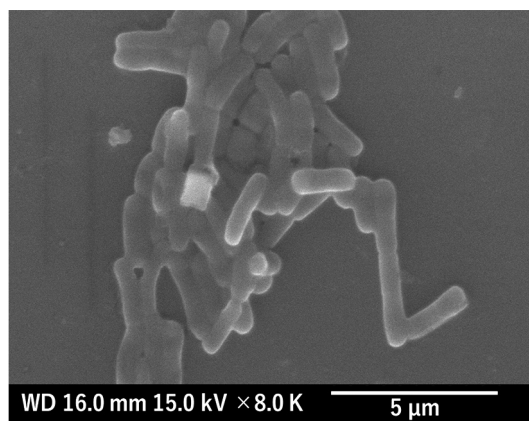


図1: *Bacillus pumilus* NBRC12092 (倍率 8,000 倍)

2.5 サッチ分解菌内包カプセルへの保護剤添加

2.4項の手法で調製したゲルカプセルを、異なる濃度の糖類(グルコース、スクロース、トレハロース)水溶液に 3 h 浸漬した。糖類の溶液濃度は 0.2, 0.4 および 0.6 mol/L で調製した。カプセルはろ過、回収し、12 h 凍結乾燥した。

2.6 保護剤による乾燥時のサッチ分解菌の安定性

凍結乾燥時の負荷に対する保護性能を評価する。保護剤添加有無のカプセルに関して、凍結乾燥前と乾燥後のカプセル内の生菌数を測定した。測定した生菌数から生存割合 (-) を式 (2) に基づいて算出した。生存割合が高いほど乾燥過程で菌が減らず、細胞死を防げたことを意味する。

$$\text{生存割合} = \text{Log } N / \text{Log } N_i \quad (2)$$

N_i および N は、それぞれ乾燥前および乾燥後のカプセル 1 g 当たりのカプセル内生菌数である。

2.7 調製したカプセルの安定性試験

カプセル調製直後を保存日数 0 日として、0、7、14、21 日間保存したカプセルを用いて安定性試験を実施した。カプセル 0.1 g を CMC-Na を溶解した HEPES 水溶液 200 ml の入った三角フラスコ内に加え、30 °C に設定したインキュベーター内で 3 日間、150 rpm で撹拌した。撹拌開始時と終了後の溶液の粘度を回転式粘度計 (LVDV-E 英弘精機株式会社製) にて測定し、溶液の粘度変化からカプセルの分解力を評価した。また分解試験と同様にして、カプセル内の分解菌が生きたまま保持できているかを確かめるべく、保存開始時から 0、7、14、21 日経過時に、カプセル内生菌数を測定して評価した。

2.8 サッチ分解菌内包カプセル内生菌数の測定

カプセルに内包されたサッチ分解菌の生菌数を測定するために、20 ml のクエン酸ナトリウム水溶液 (pH7 に調整) の入ったサンプル瓶にカプセルを 45 個加え、カプセルを溶解した。こうしてできた菌懸濁液を生理食塩水で段階希釈した。各試料をプラスチックシャーレに薄く広げた寒天培地 (702 培地に寒天粉末を加えたもの) の表面に滴下し、コーンラージ棒で塗り広げた。シャーレに蓋をして、30 °C のインキュベーター (SLI-450N 東京理化学器械株式会社製) に入れて 48 h 静置培養することで、培地表面にコロニーを形成させた。このコロニーを計数することで生菌数を算出した。

3. 結果と考察

3.1 サッチ分解菌のセルロース分解試験結果

本研究で選択したサッチ分解菌はいずれも自然中に存在し、容易に増殖可能であるため、工業的規模での利用に適していることが報告されている (吉田他, 2015)。表 1 に候補となる分解菌を CMC-Na 溶液に加えて撹拌したときの、水溶液の粘度変化を測定した結果を示した。この粘度の減少は、サッ

表 1：サッチ分解菌のセルロース分解試験結果 (n = 3)

サッチ分解菌	$\Delta \eta$ (cp)
無菌(コントロール)	0.30 ± 0.72
<i>Bacillus pumilus</i> NBRC12092	15.7 ± 0.07
<i>Bacillus subtilis</i> NBRC13714	0.90 ± 0.20
<i>Bacillus megaterium</i> NBRC15308	7.10 ± 2.72
<i>Cellulomonas sp.</i> NBRC16064	0.90 ± 0.49

チの主要成分であるセルロースが分解されたことによるものである。結果より、*Bacillus pumilus* NBRC12092 を加えた溶液が、最も粘度が減少していることから、使用する菌体として最も適していることが確認できた。よって、以降の検討は *Bacillus pumilus* NBRC12092 を内包したカプセルで行うこととした。

3.2 サッチ分解菌内包カプセルの調製結果

図 2 にカプセルを乾燥している時のサッチ分解菌の安定性の評価結果を示した。保護剤未添加のカプセルは、内包していた菌が大きく減少した。微生物の細胞膜の構造が安定している要因も 1 つとして、細胞内外の水分子によって働く水素結合が挙げられるが、乾燥が進行していくとその水分が失われる。これにより、細胞膜が構造を維持できなくなりやがて細胞死に至る。一方、保護剤を添加したカプセルは、サッチ分解菌の生存割合が高いことが確認できた。糖が細胞膜の構造を維持している水分子に代わって水素結合することで構造が安定化し、保護効果が高まったことが考察できる。また凍結乾燥は乾燥前に予備凍結を行うが、その際に細胞内外に発生する氷結晶は細胞の微細構造を破壊して悪影響を及ぼす。こういった現象に対しても、細胞表面に結合した保護剤は保護したと考えられる。

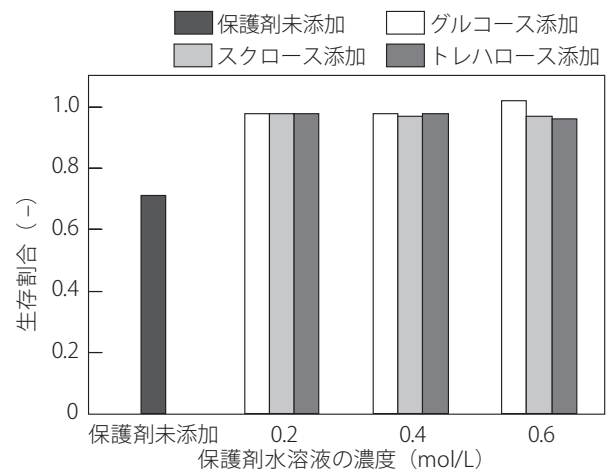


図 2：保護剤水溶液に浸漬した *Bacillus pumilus* NBRC12092 内包カプセルの凍結乾燥負荷に対する保護効果

今回得られた結果からは、糖類溶液による保護効果と濃度の依存性は確認されなかった。カプセルの選定に関しては、トレハロースは他の糖と比較して高価であることから費用対効果が低く、スケールアップを考えた場合に問題がある。加えて、0.6 mol/L の糖類溶液で調製したカプセルはべたつきがあり、凝集しやすかった。また、サッチ分解菌の安定化に水素結合が関与していることを考慮して、単糖類であるグルコースよりも OH 基を多く持つスクロースを選択し、その濃度を 0.2 mol/L とした。

3.3 サッチ分解菌内包カプセルの安定性評価結果

図 3 に保護剤添加および未添加のカプセルの保存時の形態

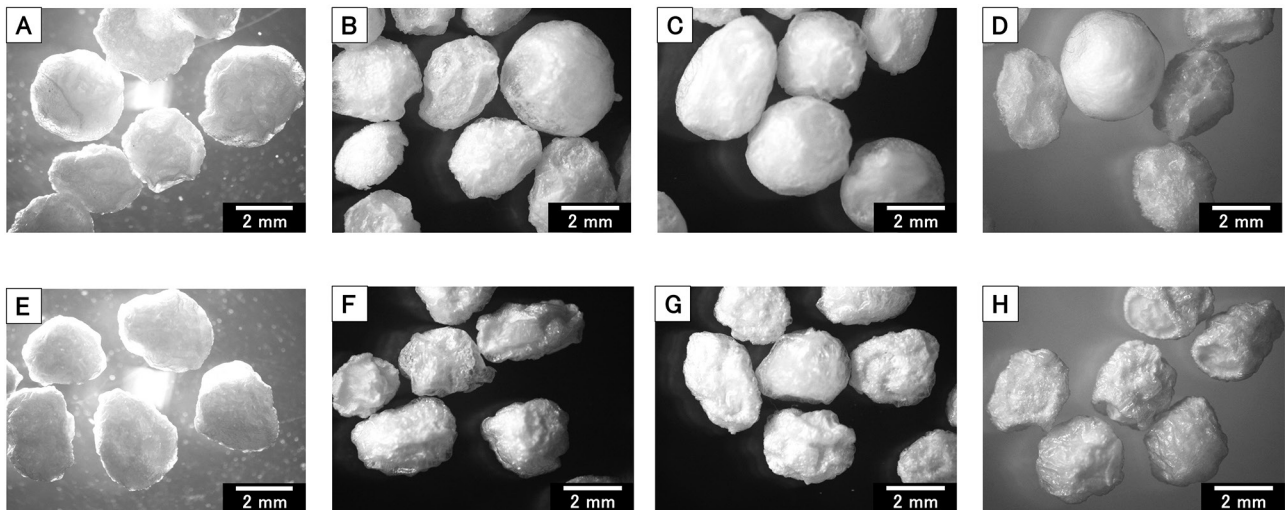


図3: *Bacillus pumilus* NBRC12092 内包カプセルの形態

注: スクロース添加 / (A) 0日、(B) 7日、(C) 14日、(D) 21日。スクロース未添加 / (E) 0日、(F) 7日、(G) 14日、(H) 21日。

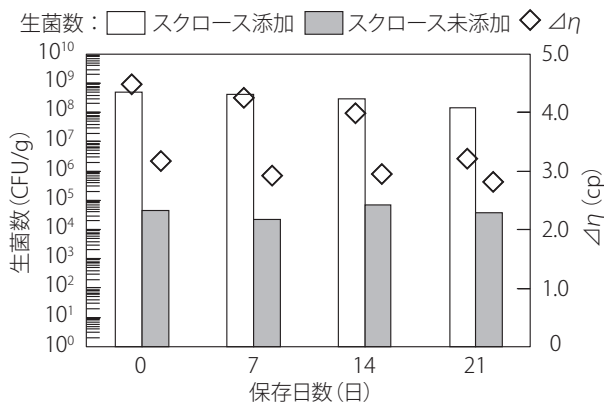


図4: 凍結乾燥したカプセルの保存試験

を示した。双方のカプセルも見た目に変化はなかった。また、図4に21日間カプセルを保存した時のカプセル内生菌数と分解効果の推移を示した。保護剤を添加することで、21日経過した後も約 10^8 CFU/g と高い生菌数を保持していた。また分解効果に関しても保護剤を添加したカプセルの方が21日後でも上回り、分解能力の保持が確認できた。

4. まとめ

本研究では、サッチ分解菌内包カプセルに使用する分解菌の選定を行い、分解力の向上を図った。またカプセルにおいては、既往の研究で開発されていたサッチ分解菌内包カプセルに保護剤(糖類溶液)を添加した新たなカプセルを調製し評価を行った。その中でも、もっとも調製条件に適していた0.2 mol/Lスクロースを添加したカプセルに対し、長期の保存と活性の保持が可能であるか評価した。その結果、サッチ分解菌は *Bacillus pumilus* NBRC12092 が最も高い分解効果を発揮した。カプセルに関しては、スクロースを添加することで調製時の凍結乾燥時の負荷から分解菌を保護することができただけでなく、調製後のカプセルにおいても、21日後カプセル約 10^8 CFU/g と高い生菌数を保持し、セルロースの分解能力

も向上させることができた。

引用文献

- Archacka, M., Białas, W., Dembczyński, R., Olejnik, A., Sip, A., Szymanowska, D., Celińska, E., Jankowski, T., Olejnik, A., and Rogodzińska, M. (2019). Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. *Food Chemistry*, Vol. 274, 733-742.
- 江原薫(1984). 第2増訂 芝草と芝地 造成と管理. 養賢堂.
- 川端孝博(2007). 植物残渣を分解・減容する新規バチルス菌株. 日本特許第4904122号.
- Kim, D., Lee, S., and Park, H. (2017). Effect of air-blast drying and the presence of protectants on the viability of yeast entrapped in calcium alginate beads with an aim to improve the survival rate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 101, 93-102.
- 根井外喜男(1972). 凍結・乾燥と保護物質. 東京大学出版.
- Seth, D., Mishra, H. N., and Deka, S. C. (2017). Functional and reconstitution properties of spray-dried sweetened yogurt powder as influenced by processing conditions. *International Journal of Food Properties*, Vol. 20, 1603-1611.
- Shaharuddin, S. and Muhamad, I. I. (2015). Microencapsulation of alginate-immobilized bagasse with *Lactobacillus rhamnosus* NRRL 442: Enhancement of survivability and thermo-tolerance. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 119, 173-181.
- 吉田昌弘・幡手泰雄(2013). サッチ分解菌内包マイクロカプセルと、これを用いた芝生地の保全方法、及び該マイクロカプセルの製造方法. 日本特許第5397942号.
- 吉田昌弘・幡手泰雄(2015). サッチ分解菌内包マイクロカプセルと、これを用いた芝生地の保全方法、及び該マイクロカプセルの製造方法. 日本特許第5721240号.
- (受稿: 2021年2月17日 受理: 2021年3月24日)