

# 微生物包含マイクロカプセルの合成とその性質 (II)

## ——根粒菌包含マイクロカプセル——

窪田茂男・英 謙二・白井汪芳

信州大学繊維学部機能高分子学科

北 條 舒 正

信州大学

### I 緒 言

前回我々は、パン酵母包含マイクロカプセルの合成とカプセルからの酵母の増殖、カプセルを用いての不斉還元反応などの性質について報告した<sup>1)</sup>。今回は、有用微生物の固定化<sup>2,3)</sup>という面から根粒菌 (*Rhizobium*) に着目した。

根粒菌<sup>4,5)</sup>は、ニトロゲナーゼ酵素を有し、この酵素により大気中の窒素を常温常圧下でアンモニアに還元して、空気中の窒素を固定化するという機能を持ち、マメ科植物との共生により、高い窒素固定を発現するという能力を持っている。また、農業生産や砂漠緑化など現実的なニーズとして窒素固定化は重要な問題であり、実際に根粒菌の人工接種が行なわれている。

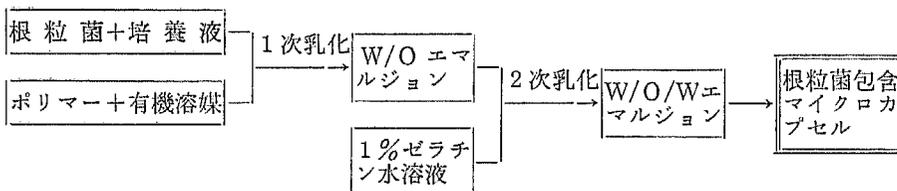
本研究では、根粒菌をマイクロカプセル中に包含することにより土壌改質材としての利用を考え、前報のパン酵母の場合と同様な方法を用いて根粒菌包含マイクロカプセルを合成し、その性質について検討した。

### II 実 験

#### 1 根粒菌包含マイクロカプセルの合成

根粒菌包含マイクロカプセルは、界面沈殿法<sup>6,7)</sup>と界面重合法<sup>6)</sup>の二通りの方法により合成した。

##### 1-1 界面沈殿法による根粒菌包含マイクロカプセルの合成



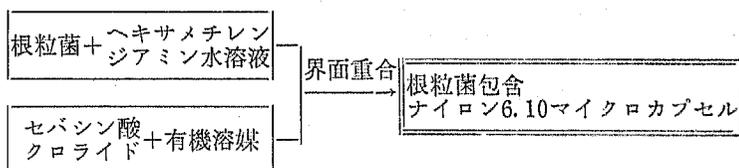
## (1) 試 薬

ポリスチレン, ポリ酢酸ビニル, エチルセルロース, トリアセチルセルロース, ポリメタクリル酸メチル, ポリカーボネート, ゼラチン, クロロホルムは, 市販品をそのまま用いた。ジクロロメタンは市販特級品を用いた。根粒菌は, 日清化学株式会社上田工場より供与されたダイズ根粒菌 (*ZA1 Rhizobium japonicum IFO 13338*), エンドウ根粒菌 (*ZA2 Rhizobium leguminosarm IFO 14168*) を使用した。

## (2) 合成方法

ポリマー (ポリスチレン, ポリ酢酸ビニル, エチルセルロース, トリアセチルセルロース, ポリメタクリル酸メチル, ポリカーボネート) 2.0g を 18.0g のジクロロメタン (トリアセチルセルロースの場合はクロロホルムを使用) に溶解し,  $1.8 \times 10^7$  個/ml の濃度で根粒菌を含む 3.0ml の培養液 (Yeast extract 0.2%, Mannitol 0.5%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1%, pH7.0) を加え, マグネチックスターラーで攪拌して 1 次乳化させ, W/O エマルジョンとした。このエマルジョンを 1% ゼラチン水溶液中に加え, ケミスターラー (羽根径 30mm, 6 枚羽根) により 620rpm で 2 次乳化させ, W/O/W エマルジョンとし, これを  $40^\circ C$ , 1.5 時間攪拌して根粒菌包含マイクロカプセルを合成した。カプセルは滅菌水で数回洗浄して使用した。なお, 使用した水溶液等はすべてオートクレーブ ( $120^\circ C$ , 15 分間) で滅菌した。

## 1-2 界面重合法による根粒菌包含マイクロカプセルの合成



## (1) 試 薬

ヘキサメチレンジアミン, セバシン酸クロライドは, 蒸留精製品を, 炭酸ナトリウムは市販特級品を, 炭酸水素ナトリウムは市販一級品を, また, シクロヘキサン, クロロホルム, Tween 20 は市販品を用いた。根粒菌は, 日清化学株式会社上田工場より供与されたダイズ根粒菌 (*ZA1 Rhizobium japonicum IFO 13338*), エンドウ根粒菌 (*ZA2 Rhizobium leguminosarm IFO 14168*) を使用した。

## (2) 合成方法

1.6-ヘキサメチレンジアミン 0.88g, 炭酸水素ナトリウム 0.32g, 炭酸ナトリウム 1.32g を含む水溶液 20ml に少量の活性炭を加えて自然ろ過し, この水溶液 2.5ml に根粒菌と滅菌水を加えて 3.0ml (菌濃度  $1.8 \times 10^7$  個/ml) とした。これを氷冷下に保存し I 液とした。シクロヘキサン 20.0ml とクロロホルム 5.0ml を混合し, 氷冷下に保存し, 重合直前にセバシン酸クロライド 0.1ml 加え, これを II 液とした。ゆっくり攪拌しながら II 液に I 液を滴下し, 10 分間放置して根粒菌包含ナイロン 6.10 マイクロカプセルを得た (Fig. 1)。その後, 過剰の有機溶媒を除去し Tween 20 の 50% 水溶液を加えて 2 分間攪拌し, さらに滅菌水を 50ml 加えて 2 分間攪拌した。過剰の溶液を除去し数回滅菌水で洗浄して有機溶媒を除いた。なお, 使用した水溶液等はすべてオートクレーブ

ープ (120°C, 15分間) で滅菌した。

## 2 根粒菌包含マイクロカプセルからの根粒菌の増殖観察

2-1 根粒菌増殖培地上での根粒菌包含マイクロカプセルからの増殖観察

### (1) 根粒菌増殖培地

Yeast extract 0.2%, Mannitol 0.5%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1%, pH 7.0, 寒天 1.8% より成る培地を, 5ml ずつ, 耐熱キャップ付ねじ口試験管に入れ, オートクレーブ中で, 120°C 15分間滅菌し, これを斜面培地とした。

### (2) 根粒菌増殖の観察

1-1 で合成した界面沈殿法による根粒菌包含ポリスチレン,

ポリ酢酸ビニル, エチルセルロース, トリアセチルセルロース, ポリメタクリル酸メチル, ポリカーボネートの各マイクロカプセルを斜面培地に移植して, 25°C で 48 時間培養し, それぞれのマイクロカプセルからの根粒菌の増殖の様子を観察した。1-2 で合成したナイロン6・10根粒菌包含マイクロカプセルは, 滅菌水中のものを斜面培地に移植して, 25°C で 48 時間培養し, カプセルからの根粒菌の増殖を観察した。

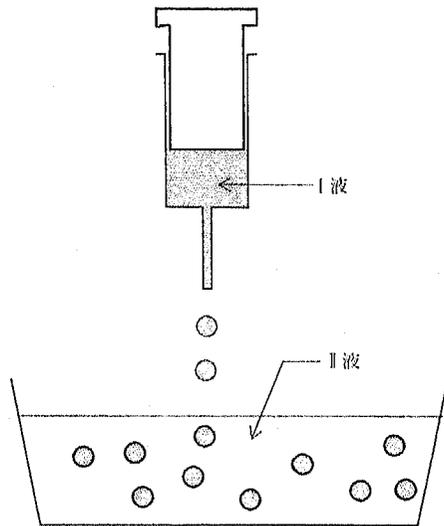


Fig. 1 Preparation of Nylon-6, 10 Microcapsule containing *Rhizobium*

## III 結果と考察

### 1 合成した根粒菌包含マイクロカプセルの形状と根粒菌の増殖

界面沈殿法により合成したトリアセチルセルロース, ポリメタクリル酸メチル, ポリカーボネートの根粒菌包含マイクロカプセルの形状を Fig. 2 に示した。

また, ポリスチレン, ポリ酢酸ビニル, エチルセルロース, トリアセチルセルロース, ポリメタクリル酸メチル, ポリカーボネートの根粒菌包含マイクロカプセルおよび界面重合法により合成したナイロン6・10根粒菌包含マイクロカプセルの直径と斜面培地に移植した時の増殖の様子を Tab. 1 に要約した。

エチルセルロースマイクロカプセルに包含した根粒菌のカプセルからの増殖の割合は極めて大きかったのに対して, ポリカーボネートマイクロカプセルに包含した根粒菌のマイクロカプセルからの増殖は認められなかった。これは, マイクロカプセル表面にできている細孔が, エチルセルロースマイクロカプセルでは比較的大きいのに対し, ポリカーボネートマイクロカプセルでは, この細孔が極めて小さいために, 根粒菌が漏れにくく増殖しなかったものと思われる。

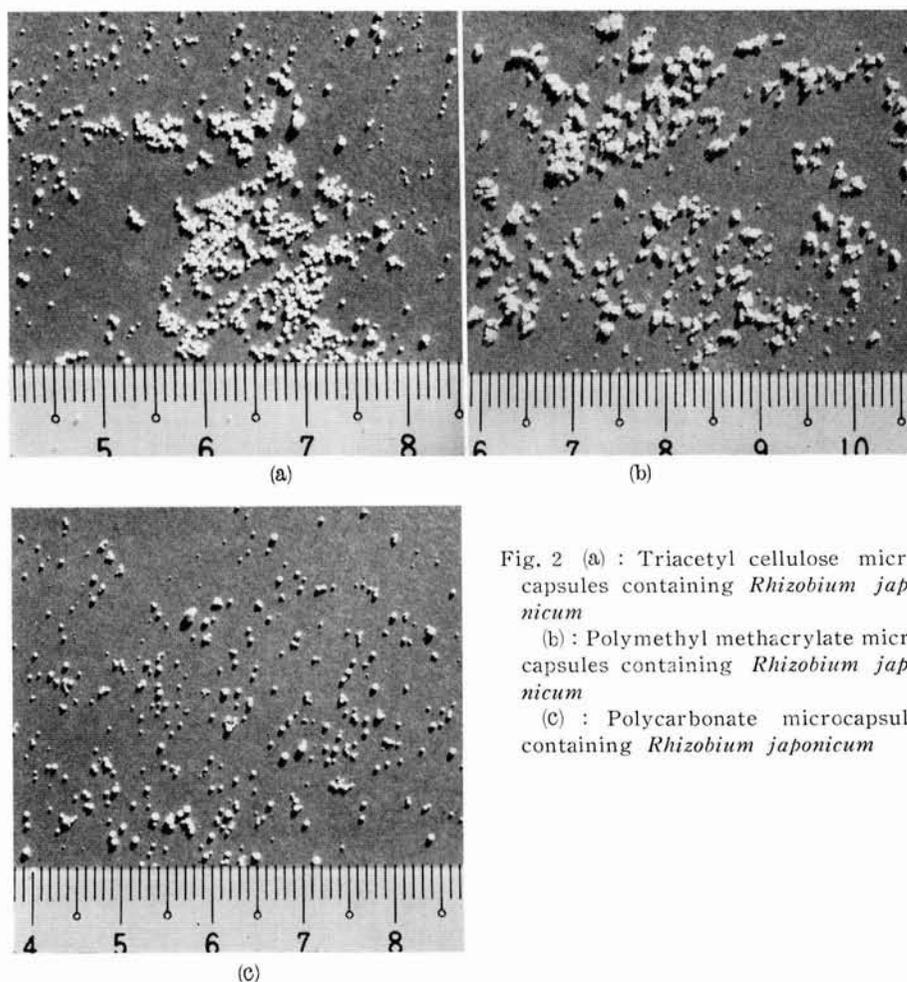


Fig. 2 (a) : Triacetyl cellulose microcapsules containing *Rhizobium japonicum*  
 (b) : Polymethyl methacrylate microcapsules containing *Rhizobium japonicum*  
 (c) : Polycarbonate microcapsules containing *Rhizobium japonicum*

エンドウ根粒菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 包含ポリスチレンマイクロカプセルを斜面培地に移植し、25°Cで48時間培養したものの写真を Fig. 3 に示した。マイクロカプセルに包含されていた根粒菌が増殖している様子が認められる。

また、ポリカーボネートを除く他のポリマーにおいても、根粒菌の増殖度の違いはあるものの、マイクロカプセルからの菌の増殖が認められた。

サイズ、エンドウの2種類の根粒菌の違いとポリマーとの関係は、差異が認められなかったが、増殖速度は、根粒菌のみの培養<sup>8)</sup>と同様に、エンドウ根粒菌の方が速いことが観察された。

さらに、エンドウ根粒菌包含ポリスチレンマイクロカプセルを2ヶ月放置した後、斜面培地に移植したところ Fig. 4 に示したように、マイクロカプセルからの根粒菌の増殖が観察された。このことにより、根粒菌はポリスチレンマイクロカプセル中で2ヶ月以上の生存が可能であることがわかった。

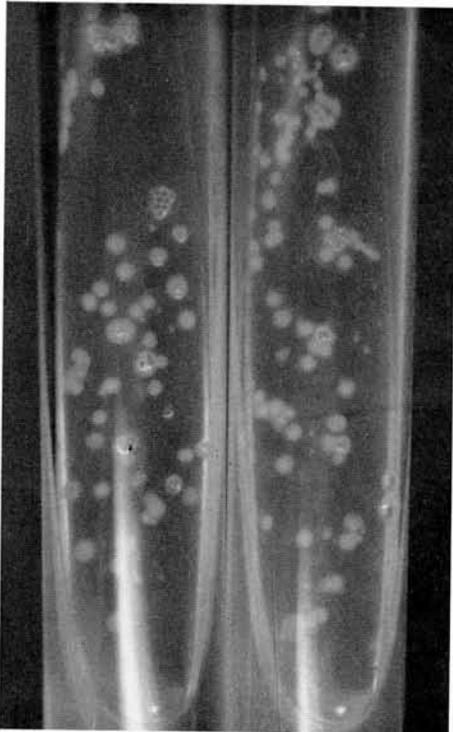


Fig. 3 Cultured *Rhizobium* by transferring Polystyrene Microcapsules containing *Rhizobium leguminosarum* to Medium

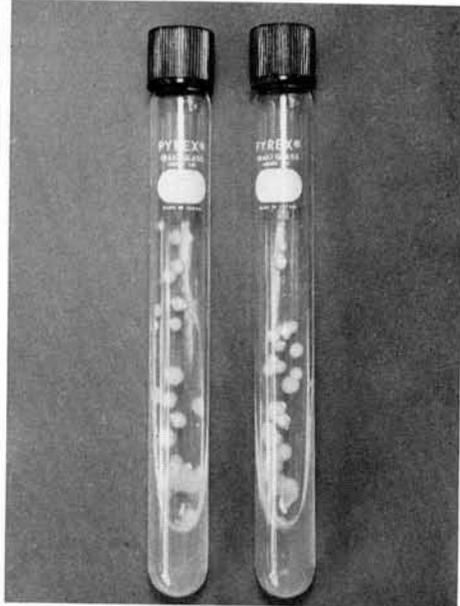


Fig. 4 Cultured *Rhizobium* by transferring Polystyrene Microcapsules containing *Rhizobium leguminosarum* to Medium

Table 1. Preparation of microcapsules containing *Rhizobium*

Polymer	Method <sup>a)</sup>	Diameter of microcapsule ( $\mu\text{m}$ )	Proliferation potency <sup>b)</sup>	
			ZA 1 <sup>c)</sup>	ZA 2 <sup>d)</sup>
Polystyrene	A	50—200	+	+
Polyvinyl acetate	A	50—200	+	+
Ethyl cellulose	A	50—500	++	++
Triacetyl cellulose	A	50—200	+	+
Polymethyl methacrylate	A	50—200	+	+
Polycarbonate	A	50—200	-	-
Nylon-6,10	B	200—2000	+	+

a) A : Interfacial precipitation, B : Interfacial polymerization

b) ++ : vigorously, + : moderately, - : slightly

c) ZA 1 *Rhizobium japonicum* IFO 13338

d) ZA 2 *Rhizobium leguminosarum* IFO 14168

#### IV 結 論

ダイズおよびエンドウ根粒菌を包含した14種類のマイクロカプセルを界面沈殿法（ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、エチルセルロース、トリアセチルセルロース、ポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネート）と界面重合法（ナイロン6・10）の2方法により合成した。マイクロカプセル中に包含された根粒菌は、培地上に移殖するとマイクロカプセルの周囲から新しく根粒菌が増殖することより、生存していることを確認した。しかし、ポリカーボネート根粒菌包含マイクロカプセルでは、培地上に移殖してマイクロカプセルからの根粒菌の増殖は認められなかった。これは、ポリカーボネートの素材としての特質とマイクロカプセル表面の細孔が小さいことによるものと思われる。

また、根粒菌包含マイクロカプセルを2ヶ月放置した後においても、マイクロカプセルからの根粒菌の増殖が認められたことにより、生菌数の割合の高い接種材料を播種直前に種子にまぶすか混ぜる従来の方法とは別の根粒菌接種方法になる可能性があると思われる。

根粒菌は一般に、マメ科植物との共生というシステムにより、根粒を形成し大気中の窒素を効率的に固定している。これは、根粒菌の持つニトロゲナーゼ酵素が酸素に対して不安定で、大気中の酸素によって失活してしまうため、根粒細胞中のレグヘモグロビンが、酸素供給量を調節することにより、酵素の還元作用が働き大気中の窒素を固定できるのである。一方、マメ科植物の根粒菌は、非共生状態<sup>9-11)</sup>においても、共生と比較すると窒素固定率はひとけた以上低いものの窒素固定ができる。これは、マイクロカプセルの素材に酸素濃度を調節できるポリマーを使用することにより、非共生的に大気中の窒素固定能を有する根粒菌包含マイクロカプセルが作成できる可能性を示唆している。

したがって、根粒菌包含マイクロカプセルは、根粒菌の持つ大気中窒素固定能という意味において、簡便な土壌改質材や人工栽培の培地として利用できるであろう。この根粒菌包含マイクロカプセルは、バイオテクノロジー・バイオミメティックの一分野として今後の応用が期待される。

#### 文 献

- 1) 英 謙二, 窪田茂男, 白井汪芳, 北條舒正: 信州大学繊維学部紀要, No.99 Ser. C. Chemistry. No.14, 27 (1986)
- 2) 千畑一郎: 固定化酵素, (1975) 講談社サイエンティフィク
- 3) 千畑一郎: 固定化生体触媒, (1986) 講談社サイエンティフィク
- 4) 三浦謙一郎, 西村 肇, 井上祥平, 古崎新太郎: 工学のためのバイオテクノロジー, (1986) 講談社サイエンティフィク
- 5) 土壌微生物研究会: 土の微生物, (1981) 博友社
- 6) 近藤 保, 小石真純: マイクロカプセル (その製法・性質・応用), (1978) 三共出版
- 7) 東出福司, 牛川 務: 薬剤学, 34, 72 (1974)

- 8) 柳田友道：微生物科学4生態, (1984) 学会出版センター
- 9) Pagan, J.D., Child, J. J. Sco wcroft, W.R. and Gibson, A.H. : Nature 256, 406 (1975)
- 10) Kurz, W.G.W. and LaRue, T. A. : Nature 256, 407 (1975)
- 11) McComb, J. A., Elliott, J and Dilworth, M. J. : Nature 256, 409 (1975)

### Summary

## The Syntheses and Properties of Microcapsules containing Microorganism (II)

— Microcapsules containing *Rhizobium* —

Shigeo KUBOTA, Kenji HANABUSA and Hirofusa SHIRAI

*Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu  
University, Ueda, Japan*

Nobumasa HOJO

Shinshu University, Matsumoto, Japan

Fourteen microcapsules containing *Rhizobium japonicum* or *Rhizobium leguminosarm* were prepared by the interfacial precipitation (polystyrene, polyvinylacetate, ethyl cellulose, triacetyl cellulose, polymethylmethacrylate and polycarbonate) and the interfacial polycondensation (nylon 6, 10).

The transplantation of microcapsules containing *Rhizobium* on culture medium resulted in the multiplication of *Rhizobium* except polycarbonate microcapsule. It indicated that *Rhizobium* were living in all microcapsules except polycarbonate one. Especially, *Rhizobium* from ethyl cellulose microcapsule multiplied intensively. It seemed that the hole on the surface of ethyl cellulose microcapsule was large enough for *Rhizobium* to leak, on the contrary, the hole on the surface of polycarbonate microcapsule was too small to leak.

The survival of *Rhizobium* in microcapsule after two months was confirmed by the multiplication on culture medium. These results suggested that microcapsules containing *Rhizobium* will be able to be used as the new *Rhizobium* inoculation method instead of the usual direct mixing of *Rhizobium* and seeds.

## Already published

Journal of the Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University

Whole No. (Unwritten from 1 to 12)	Formerly (1951-56) Written as Vol. & No.	Year	Series & No.						
			A	B	C	D	E	F	
No. 1	Vol. 1	1951	1*						
" 2	" "	"	"						
" 3	No. 2	1952	2		1*				
" 4	" "	"	"	2°					
" 5	" 3	1953	3						
" 6	" 4	1954	4						
" 7	" 5	1955	5						
" 8	" "	"	"			2			
" 9	" "	"	"					1	
" 10	" 6	1956	6						
" 11	" "	"	"			3			
" 12	" "	"	"				1		
-----									
" 13		1957	7						
" 14		"	"					2	
" 15		"	"	3					
" 16		"	"		4				
" 17		1958	8						
" 18		"	"			5			
" 19		"	"				2		
" 20		1959	"					3	
" 21		"	"					4	
" 22		"	"			6			
" 23		1960	9						
" 24		"	"	4					
" 25		"	"				3		
" 26		1961	10						
" 27		"	"			7			
" 28		"	"				4		
" 29		"	"					5	
" 30		1962	11						
" 31		"	"	5					
" 32		"	"			8			
" 33		"	"				5		
" 34		"	"					6	
" 35		"	"						1
" 36		1963	12						
" 37		"	"				6		
" 38		"	"						2
" 39		1964	13						
" 40		"	"	6					
" 41		"	"				7		
" 42		1965	"	7					
" 43		"	"				8		
" 44		1966	"	8					
" 45		"	"				9		
" 46		1967	"	9					
" 47		"	"				10		
" 48		1968	"	10					
" 49		"	"			9			
" 50		"	"				11		

Whole No. (Unwritten from 1 to 12)	Formerly (1951-56) Written as Vol. & No.	Year	Series & No.						
			A	B	C	D	E	F	
// 51		1969	14						
// 52		//				12			
// 53		1970	15						
// 54		//			10				
// 55		//				13			
// 56		1971			11				
// 57		//				14			
// 58		1972	16						
// 59		//				15			
// 60		1973				16			
// 61		1974	17						
// 62		//		11					
// 63		//			12				
// 64		//				17			
// 65		//					7		
// 66		1975	18						
// 67		//				18			
// 68		//					8		
// 69		1976	19						
// 70		//		12					
// 71		//				19			
// 72		1977				20			
// 73		1978	20						
// 74		//		13					
// 75		//				21			
// 76		//					9		
// 77		1979	21						
// 78		//		14					
// 79		//				22			
// 80		//					10		
// 81		1980	22						
// 82		//				23			
// 83		1981	23						
// 84		//				24			
// 85		//							3
// 86		1982		15					
// 87		//				25			
// 88		//							4
// 89		1983				26			
// 90		1984		16					
// 91		//				27			
// 92		//							5
// 93		1985	24						
// 94		//			13				
// 95		//				28			
// 96		//							6
// 97		1986	25						
// 98		//		17					
// 99		//			14				
// 100		//				29			
// 101		//							7
// 102		1987			15				
// 103		//				30			