

微細加工技術を用いた  
バクテリアセルロースの成形と生産

2017 年度

東 和彦

# 目次

第1章 序論 .....	1
1.1 バクテリアセルロース (BC) の材料特性.....	2
1.2 応用 .....	4
1.3 従来研究 .....	6
1.3.1 加工技術.....	6
1.3.2 生産性の向上.....	7
1.4 本論文の目的.....	8
1.5 本論文の構成.....	9
第2章 微生物培養の理論と実験.....	10
2.1 緒言 .....	10
2.2 微生物培養の理論.....	10
2.3 BC 産生菌 .....	16
2.3.1 特性 .....	16
2.3.2 培養実験.....	18
2.4 結言 .....	20
第3章 微細構造を有する BC 膜の成形技術 .....	21
3.1 緒言 .....	21
3.2 プロセス概要.....	22
3.3 実験 .....	23
3.3.1 マスターモールドの作製.....	23
3.3.2 微細構造を有する BC 膜の作製 .....	29
3.3.3 最小構造の評価.....	30
3.3.4 膜厚の評価.....	34
3.4 結言 .....	37
第4章 BC 微小球の成形技術 .....	38
4.1 緒言 .....	38
4.2 製作プロセスの概要.....	39

4.3	乳化法によるゼラチン微小球の調製.....	42
4.3.1	エマルジョン安定性.....	42
4.3.2	油／界面活性剤系の決定.....	45
4.4	マイクロ流体デバイスによるゼラチン微小球の調製.....	50
4.4.1	液滴生成デバイス.....	50
4.4.2	理論 .....	51
4.4.3	デバイスの製作.....	53
4.4.4	実験 .....	55
4.5	BC 微小球の成形 .....	57
4.6	結言 .....	61
第5章	ハイドロゲルチューブによる屋外培養法.....	62
5.1	緒言 .....	62
5.2	従来の屋外培養法.....	62
5.3	本研究で提案する手法.....	64
5.4	理論 .....	65
5.5	実験 .....	67
5.5.1	微生物チューブの形成.....	67
5.5.2	微生物の培養.....	72
5.5.3	微生物チューブの高強度化.....	75
5.6	結言 .....	81
第6章	結論 .....	82
6.1	結論 .....	82
6.2	今後の展望 .....	84
	謝辞.....	85
	参考文献.....	87

# 第1章

## 序論

セルロースは地球上に最も多く存在するバイオマスとして、人類の文明史に寄与してきた。情報媒体としての紙、衣類のための繊維、そして近年ではセルロースナノファイバ (CNF) の構造材料としての利用が進んでいる。これらの原料となるのは木材由来のパルプであるが、急激な人口増加に伴う急速な森林面積の減少は、環境への大きな脅威である。

一方、原核生物である真正細菌の中にもセルロースを生成する種が存在する。こうした細菌から産み出されるセルロースはバクテリアセルロース (BC) と呼ばれ、その性質の違いから植物セルロースとは明確に区別される。サイズが小さく、大きな比表面積をもつ原核生物は、植物を含む真核生物よりも3倍以上代謝速度が高い[1]。これはすなわち、原核生物は真核生物よりもエネルギー利用効率が3倍以上高いことを意味し、BCが植物に替わるセルロース供給源となる可能性を示唆する。しかし、BCの産業利用は現在のところバイオ医療分野の高付加価値製品に限られている。これは、現在の技術水準ではBCの生産コストが高いためである。この現状を打開し、BCを新たなセルロース供給源として産業に組み込むことが可能となれば、森林に依存した現在の経済構造を変えることができる。

本研究では、2つの方向からこの目的の達成を試みた。1つは、BCの微細成形技術を確立することにより、付加価値を向上することである。成形する形状別に、BCの平坦な膜上に微細構造体を形成するための製作プロセスと、マイクロメートルオーダーの直径をもつ微小球の製作プロセスの2つを提案する。もう1つのアプローチとして、生産コストを大幅に削減するため、生物汚染を回避可能な屋外培養方法を提案する。本手法は、ハイドロゲルで作製した微小な中空チューブ内で微生物を培養することで、BC生産に必要な栄養素の吸収と老廃物の除去を行いながら、周囲環境に存在する競合微生物の侵入を防ぐという方法である。

本章では、BCの材料特性と本研究との併用が可能な応用技術、そして従来研究について述べ、本論文の予備知識を与えるとともに、本論文の目的を述べる。

## 1.1 バクテリアセルロース (BC) の材料特性

構造式の上では、BCは植物セルロース同様、 $\beta$ -D-グルコース重合体である。しかし、両者には多くの相違点が存在し、BCの植物セルロースに対する優位性から多くの研究がなされてきた。

植物セルロースにはリグニンやヘミセルロースなどの不純物が含まれ、セルロースの比率は40%程度にとどまる。一方、BCは純粋なセルロースのみから成るため、精製にかかるコストを大幅に低減できる。

また、BCの重合度(DP<sub>w</sub>=16000)は植物セルロースよりも高く、コットン(DP<sub>w</sub>=5000)や広葉樹パルプを(DP<sub>w</sub>=12000)を上回る[2]。これにより、ガラス転移点は300°C程度と熱的な安定性も高い[3]。

さらに、植物セルロースとBCには結晶構造においても相違点がある。天然セルロース繊維には、セルロースI $\alpha$ とI $\beta$ と呼ばれる2つの結晶形があり、植物セルロースではほとんどがI $\beta$ 結晶相である一方、BCではI $\alpha$ 相65%、I $\beta$ 相35%の割合で複合結晶を構成しているとされる[4]。I $\alpha$ は一本鎖の三射晶で、格子の内角は全て90度でない準安定構造であるため、高温などの処理でI $\beta$ に変態することが知られる。I $\beta$ は二本鎖の単射晶の結晶格子からなり、I $\alpha$ よりも安定な構造である。また、コットンなどの植物セルロースは結晶化度が50-60%程度であるのに対して、BCの結晶化度は95%以上と極めて高い。

これらの性質は、CNFの供給源としてBCをみたときに極めて有用である。植物セルロースにおいて、セルロース分子は30-40本の規則的な束である幅約3nmのセルロースマイクロフィブリルを形成している。CNFはセルロースマイクロフィブリル単位、あるいはその集合体の幅数十nm以下の結晶化繊維のことを指す。パルプ中のCNFを単離することは近年まで困難であったため、その優れた性質が注目されるようになったのは近年のことである。CNFとフェノール樹脂などのプラスチック複合成形物が、構造用鋼やマグネシウム合金などの先端材料を上回る比強度をもつことが示されて以降、CNFの産業化に向けたプロジェクトが様々な国で推進されており、日本でもオールジャパン体制で研究が進められている。特に、日本の山がちな地形から木材の使用は極めて非効率であり、これを有効に活用することができれば林業が主要な輸出産業となりうる。そうした期待から、木材パルプを機械的・化学的に解せんしてCNFを取り出すことが共通の方針であるが、植物の成長速度は極めて遅い。BCは通常、CNFよりも大きなリボン状の構造をしているが、カルボキシメチルセルロース(CMC)を添加することにより、CNFを得ることができる[5,6]。これは、CMCがセルロースマイクロフィブリル表面に吸着し、フィブリル間の結合を妨げるためと考えられている。したがって、植物細胞よりもセルロース合成速度の速いBC産生菌は、植物に代わるCNFの供給源となる可能性を秘めている。

また、ハイドロゲルとしてBCをみたときに特徴的な点として、構造の特異性が挙げられる。BCは直径40-60nmのセルロースナノファイバがランダムな方向に絡み合った3次元

網目構造を有している[7]. これにより, BC は径 150-400 nm の孔同士が相互接続した多孔性ハイドロゲルでもある[8]. 多細胞生物の足場材料である細胞外マトリックス (ECM) もれに類似の高次構造を形成しており, 接着する細胞の機能発現に大きな影響をもつ. 実際, Tian らは様々な径のナノファイバを製作し, 径が小さくなるほど, 細胞の接着, 伸展性が増加することを確認している[9]. さらに, ナノファイバはバルクと比較し広大な表面積を有することから, 生体由来因子の吸着サイトを多数設計できる. また, バルクのゲルなどよりも生体物質の透過性に優れ, 細胞や生体成分の湿潤が容易に生起される. ナノファイバの作製方法は, ボトムアップ式とトップダウン式の2つに大別でき, 前者では主に材料の自己組織化現象を用いる. 例えば, ナノポア等の物質をテンプレートとして作成するといった方法が挙げられる. 一方, 後者のトップダウン式には, 電界紡糸法やレーザによる溶解延伸紡糸法といった方法が挙げられる. トップダウン式のこれらの方法は, 比較的多様な材料からナノファイバが得られる[10-14]が, 生産性の低さから実用化された製品はいまだ多くない. BC は温和な条件下で合成され, 複雑な装置も不要であるため, 応用次第では価格競争力の高いナノファイバ作成方法となりうる.

BC のナノファイバ表面に多数露出する水酸基を利用することで, 様々な性質や機能を付与することも可能である[15]. この化学修飾方法は大きく3つに大別され, 一つは水酸基をアセチル基やシラノール基などの低分子で置換する方法である. 他の方法としては, 様々な溶剤によるグラフト重合法と, 原子移動ラジカル重合などを用いたグラフト重合法がある.

また, 他の一般的なハイドロゲルと比較して BC は機械的強度が極めて高い. BC の体積の 90%以上が水であることを考えると, BC の機械的強度の高さは非常に魅力的である. さらに, 中山らは BC をゼラチン溶液に浸し, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide によってゼラチンを架橋することで, BC とゼラチンから成る DN ゲル (DN ゲル) を作製し, 機械的強度を向上させた[16]. 通常の BC では, 圧縮により容易に内部の水が外部へ放出され, 塑性変形を起こす. 一方, この DN ゲルでは, ゼラチンを組み込むことによって水の放出が抑制され, 3.7MPa の圧縮を受けたのちも元の形状へと回復した. 彼らは, ゼラチンの他にもジェランガムやアルギン酸, カラギーナンなどの多糖類高分子と BC を組み合わせることで DN ゲルを作製し, 機械的強度の向上を確認している.

さらに植物セルロースと同様, BC は生体適合性に優れた素材で, その安全性が広く認められている. Helenius らは, ラットの皮下に BC を移植し, 12 週経過後も繊維組織や異物巨細胞がみられなかったことから, BC は異物反応を引き起こさないことを確認した[17]. 移植した領域には, 発赤や腫れ, 滲出もみられなかった. 動物の ECM を構成する主要成分のコラーゲンはタンパク質であることから, HLA 型が異なるものは免疫系の認識を受け, 免疫拒絶を引き起こす. 一方, セルロースは多糖類であるため, この問題を克服できる. また, 微生物由来の物質を医療用に用いる際に問題となるエンドトキシン含有量は, BC では 0.1 EU/mL 以下である[18]. FDA が医療器具に求める基準値は 0.5 EU/mL であることから, BC から製作された製品の多くが FDA の認可を受けている.

## 1.2 応用

BCの特異な性質，特にナノファイバ材料としての構造的特徴を利用した様々な応用がこれまでに展開されている。

例えば医療分野では，KlemmらはBCの生体適合性，および化学的安定性に着目し，BCでチューブを作製し，ラットの頸動脈を一時切断後，チューブで血管をつなぎ合わせた[19]。一カ月経過後も，拒絶反応の兆候である炎症反応や血栓の形成はみられず，BCが原型のまま分解されていなかったことから，代替血管としての可能性が示された。また，筆者らは円錐形状のBCに運動性細菌を固定し，マイクロロボットの開発を行った[20]。微小空間において効率的かつ自律的に運動可能な運動性細菌は低レイノルズ数環境における理想的な動力源である。ナノファイバ材料であるBCはゼータ電位が低く，細菌に働く静電的反発力が小さいため細菌の強固な固定が可能となる。作製されたマイクロロボットは約4.8  $\mu\text{m/s}$ で駆動され，薬物送達技術などへの応用可能性が示された。

BCのナノファイバネットワーク構造をテンプレートとして利用する研究も行われている。例えば，WanらはBCをオルトケイ酸テトラエチル (TEOS) とエタノールの混合溶液に浸漬したのち水/エタノール混合溶液に移し，最後に煅焼することで自立した3次元ネットワーク構造を有するシリカナノチューブを作成した[21]。このゾルーゲル反応はBCの水酸基が触媒として機能し中性付近のpHで進行するため，容易にスケールアップが可能である。また，OlssonらはBCからフレキシブルな強磁性エアロゲルを作製することに成功した[22]。彼らは，凍結乾燥したBCを $\text{FeSO}_4$ と $\text{CoCl}_2$ の混合溶液に浸漬し，90°Cで加熱後，水酸化ナトリウムおよび硝酸カリウムの混合溶液内 (90°C) に移すことで，BCのセルロースナノファイバ上に $\text{CoFe}_2\text{SO}_4$ ナノ粒子を形成した。 $\text{FeSO}_4$ と $\text{CoCl}_2$ の混合溶液の総量を調製することで，磁性ナノ粒子の径を40-120 nmの範囲で制御できる。さらに，このエアロゲルを圧縮することにより，磁性ナノ粒子の密度が非常に高い磁性薄膜を得ることもできる。

また，近年ではBCを熱分解することで得られる電極触媒が注目されている。燃料電池や金属空気電池では，酸素還元反応 (ORR) を進行するため白金が一般的に用いられるが，白金の希少性から代替材料が求められる。Liangらは，BCを直接熱分解したのち $\text{NH}_3$ で活性化させた窒素ドーブカーボンナノファイバ (N-CNF) を作製した[23]。BCの高い比表面積を保ったN-CNFは，高い窒素含有領域 (5.8 at%) とBarrett-Emmett-Teller (BET) 表面積 (916  $\text{m}^2/\text{g}$ ) を有していた。これにより，N-CNFは $\text{NH}_3$ 処理を施されたカーボンブラックやカーボンナノチューブを含む多くの非金属触媒を上回るORR性能を示した。Laiらはさらに，窒素ドーブした炭化BCのナノファイバ上にニッケルとコバルトの酸化物を共析出することで，スーパーキャパシタ用の電極 (CBC-N@LDH) を開発した[24]。CBC-N@LDHは1  $\text{A g}^{-1}$ の放電電流密度で高い比静電容量 (1949.5  $\text{F g}^{-1}$ ) を示し，また10  $\text{A g}^{-1}$ の放電密度に対し54.7%の容量維持率を有していた。さらに，CBC-N@LDHを陽極，CBC-Nを陰極として校正した非対称スーパーキャパシタは，36.3  $\text{Wh kg}^{-1}$ という高いエネルギー密度を達成した。

BCの光学的性質を利用した応用例として、田淵らによる研究が挙げられる[25, 26]。彼らは、電気泳動における充填ゲルに粒子状のBCを用いることで、分離度と感度を向上させることに成功した。100 bp以下の10 bpごとの分離、SSCP法による一塩基多型解析 (SNPs解析) への応用、メタボリックシンドロームで重要なリポタンパク質の高精度分離に成功している。圧縮によりナノ構造を消失させたBCでは、蛍光増強が確認されなかったことから、特異的な光散乱効果はBCのナノ構造に起因していることが示唆される。さらに、マイクロ流路の入射光方向と逆側上部に回折加工を施すことにより、蛍光強度が6倍強まで増加した。これは、マイクロ流路内での光閉じ込め効果によるものと考えられている。他の光学分野への応用として、矢野らは透明でフレキシブルなBC複合体薄膜を製作した[27]。彼らはまず、ホットプレス加工によりBC薄膜を得たのち、ファイバ間の空隙をアクリル樹脂またはエポキシ樹脂で満たすことにより、80%以上の光透過率をもった厚さ約60  $\mu\text{m}$ の薄膜製作に成功した。製作された薄膜上に有機発光ダイオードを形成することで、発光素子への応用も可能である[28]。

Table 1.1 Applications of BC in various fields.

Application field	Specification	Ref.
Bio-medical	Tubular BC designed for artificial blood vessel didn't show any transplant rejection.	[17]
	Conical BC microstructure was driven at a speed of 4.8 $\mu\text{m/s}$ using motile bacteria as actuators.	[18]
Material engineering	Silica nanotube with a 3D network structure was formed using BC as the catalyst and structure directing agent.	[19]
	Lightweight porous magnetic aerogel was formed using BC as the template.	[20]
Battery	Zn-air battery using nitrogen-doped carbon nanofiber aerogel electrocatalyst showed high voltage.	[21]
	Nitrogen-doped carbonized bacterial cellulose with nickel-cobalt layered double hydroxide showed high specific capacitance.	[22]
Optics	BC fibrils contained in a lab-on-a-chip enhanced DNA detection sensitivity up to 6 times.	[23]
	BC in a low concentration polymer solution enabled high resolution electrophoretic separation of DNA.	[24]
	BC-nanofiber-reinforced polymer composite exhibited high transparency and mechanical strength.	[25]
	Acrylic resin of 0.7 mm thickness reinforced with 5 wt% of a planar BC nanofiber network was integrated with an organic light-emitting diode.	[26]



## 1.3 従来研究

### 1.3.1 加工技術

BCの加工技術は主に、トップダウンプロセスとボトムアッププロセスの2つに分けられる。

トップダウンプロセスとして、AhremらはCO<sub>2</sub>レーザーを用いてBCに穴加工を施した[29]。寒天ゲルの上に配置されたBCはパルスレーザーにより、ゲル状態のままレーザー照射方向に垂直の貫通した穴が形成される。これを様々な方向から繰り返すことで、3次元方向に貫通孔を有するBCゲルが作成された。穴は最小で数百マイクロメートルオーダーまで加工できる。ただし、ゲル状態のまま機械加工はすることは困難であり、乾燥させると3次元ネットワーク構造が不可逆的に崩壊するため、トップダウンプロセスの報告はほとんどなされていない。

ボトムアッププロセスには、数多くの研究例がある。例えば、Gatenholmのグループはパラフィンワックスとスターチの微粒子を培地内に配置し、相互接続した多孔性BCを作製した[30]。この方法では、配置する粒子の径を変化させることで孔径を自在に制御できる。培養後、パラフィンとスターチ微粒子はそれぞれ界面活性剤と分解酵素により除去される。また、Putraらはシリコンチューブ表面でBCを培養することにより、BCチューブを作成した[31]。シリコンは酸素透過性が高いため、シリコンチューブ表面でBCが形成されていく。この際、形成されるBCの繊維方向は重力方向や酸素濃度、シリコンチューブ内壁の形状にはよらず、シリコンチューブの内径に依存することが示された。他には、培養フラスコを回転させることで、球状のBCを作成することができる[32]。回転数を増やすとBCの径は減少するが、粒径は培地量によっても変化した。また、マクロな形状加工ではなく、BCの繊維方向を制御することで機械的性質を変化させた報告もある。Putraらは、polydimethylsiloxane (PDMS)の表面でBC産生菌を培養した[33]。この際、PDMSの表面構造を様々な幅をもった溝構造にすると、得られたBCは異方性の弾性率など、通常のBCとは異なる性質を示した。これは、BCの繊維方向が一方向に制御されたためと考えられる。

Table 1.2 Methods for forming BC with various geometries.

Type of process	Implementation	Geometry	Ref.
Top-down	CO <sub>2</sub> laser	Perforated	[27]
Bottom-up	Paraffin and starch microparticles	Microporous	[28]
	PDMS tube	Tubular	[29]
	Rotated flask	Spherelike	[30]
	Ridged PDMS	Oriented-fibrous	[31]

### 1.3.2 生産性の向上

BC の生産コストは依然として高いことから、生産性を改善するための研究がこれまで多くなされてきた。これらの方法は主に3つに大別される。

1つの方法は、安価な培地成分から効率的にBCを生産することで、糖蜜や廃グリセリン[34]を炭素源として用いた培養が行われている。糖蜜はビート糖製造時における副産物であり、工業的な微生物培養で広く用いられる安価な炭素源である。廃グリセリンはバイオディーゼル燃料製造時における副産物であり、原料油脂の20%程度はグリセリンとなり廃棄される。Vazquezらはバイオディーゼルからのグリセリンを炭素源に、コーンステープリカーを窒素源に用いてBC産生菌を培養し、高いBC生産量を得た。形態、結晶化度、耐熱性などの様々な点で、得られたBCは通常のグルコースを用いた培地と同様の性質を示した。BC生産において基質コストは総コストの50-65%を通常占めることから、低価格な代替成分を用いるのは必須である。

また、培養装置を改良することによって、生産性の向上が試みられている。BCは静地培養において、セルロースナノファイバが絡み合いってゲルを形成する。一方、攪拌などにより培地に流れがセルロースの合成速度は増加するが、ゲルは形成されない。そこでHofingerらは、BC産生菌と循環させた培地の間を多孔質膜で隔て、栄養素と老廃物を迅速に交換できるシステムを構築した[35]。これにより、乾燥質量で一時間当たり $0.82\text{ g/m}^2$ のBCが生産されている。

別の方法として、遺伝子工学を用いる方法によりBC生産性の向上が期待される。例えば、Floreaらは*Komagataeibacter rhaeticus*を単離し、合成生物学のためのツールキットを作成した[36]。ゲノムシーケンスにより作成されたこのツールキットを用いて、BC生産の時間的制御やタンパク質修飾など、BCの機能化がなされた。こうしたツールキットによりBC生産能力の高い菌株の作出も可能であると考えられる。特に、近年ではCRISPR-Cas9の出現[37]によりゲノム編集技術の自由度、確実性、効率が飛躍的に向上している。また、進化分子工学も発達していることから、遺伝子工学を通じたBC生産性の向上はより加速していくものと思われる。

Table 1.3 Approaches for improving the productivity of BC.

Component	Specification	Ref.
Low cost substrate	Glycerol from biodiesel for carbon source and corn steep liquor as nitrogen source were used for culture medium.	[32]
Bioreactor	Polyethersulfone membrane separating BC-producing bacteria and culture medium enhanced productivity.	[33]
Genetic engineering	Modular genetic toolkit enabled rational reprogramming of <i>Komagataeibacter rhaeticus</i> .	[34]

## 1.4 本論文の目的

これまでみてきたように、BCは有用性の高さが認められながらも、生産コストの高さから利用が限られているため、本論文では2つの方向からBCの産業利用能の向上を試みる。

1つは、新規なBC微細加工プロセスを確立することで、BCの付加価値向上を図る。具体的には、微細構造を有するBC膜を作製するためのプロセスと、マイクロメートルオーダーの直径を有する微小球の製作プロセスである。ナノファイバ材料であるBCは、その構造がECMと類似していることから、動物細胞培養のための足場材料として応用されることが多い。細胞が接着する場の局所的な形状が、細胞の形態、移動、増殖、分化および遺伝子発現などの挙動と機能に大きな影響を及ぼすので、ナノファイバ材料に微細な構造を形成する技術はバイオ医療分野への応用において、極めて重要である[38-42]。また、ナノファイバ材料から構成された微小球は、ハンドリングの容易さ、比表面積の大きさなどからマイクロキャリアや細胞送達技術といった多岐に渡る応用が期待できる。これまで、ナノファイバ材料の作製には、エレクトロスピンニング技術が主に用いられてきたが、歩留まりの悪さから製造コストが高いという欠点がある。また、電界紡糸法では隣接するジェット同士の干渉や、低流量といった問題もしばしば生じるため、ナノファイバ材料の産業利用は限られた分野に止まっている。したがって、ナノファイバ材料であるBCの膜上に微細構造を形成する技術、およびBCから微小球を作製する技術は新たな応用を生む可能性がある。本研究では、これらの製作プロセスを提案するとともに、プロセスの特徴づけを行う。具体的には、両プロセスにより作製可能な構造の最小サイズを検証する。また、微細構造を有するBC膜の成形においては、BC産生菌の培養時間とPDMS鋳型の膜厚がBC膜厚に及ぼす影響を調べる。一方、BC微小球の成形においては、鋳型となるゼラチン微小球の粒径とBC微小球の粒径との関係を明らかにする。

もう1つの方向として、BCの生産コストを低減するための新規な培養プロセスを提案する。本培養プロセスの概要は、チューブ状の半透膜で微生物を包括することで、屋外培養の際に問題となる生物汚染を回避するというものである。以下では、このチューブを微生物チューブと表記する。ハイドロゲルなどの半透膜は、微生物の栄養素、酸素、老廃物などを透過するとともに、ウイルスを含む微生物の通過を妨げる。したがって、培養対象の目的微生物は微生物チューブ内部に保持され、外部環境に存在する競合微生物からの汚染を防ぐことができる。想定する微生物チューブの利用形態として、まず汚染のリスクがない製造設備を用いて微生物チューブを生産する。これを、耕作放棄地などの土地へ輸送し、屋外培養を行う。数日間培養したのち、生産されたBCを処理設備へ輸送し、分離および回収ののち洗浄することでBCを得ることができる。なお、回収の際に分離されたBC産生細菌は再び微生物チューブの製造に再利用できるため、価格競争力の高いシステムであると考えられる。

## 1.5 本論文の構成

本論文の構成は以下の通りである。

第1章では、本論文の研究背景と関連する従来研究、本論文の社会的な意義と目的について述べた。

第2章では、微生物に関する基礎的な知識と培養の理論について述べる。それに基づき、本論文全体を通して必要となる、BC産生菌の予備実験の結果について議論する。

第3章では、微細構造を有するBC薄膜の製作プロセスについて述べ、工学的な有用性を担保する上で必要となるプロセスのパラメータおよびその影響について論じる。

第4章では、BC微小球の製作プロセスについて述べる。さらに、製作プロセスに影響を与えるパラメータについて、理論に基づいた考察を行う。

第5章では、BC産生菌を屋外培養するための新規な微生物培養方法の提案を行う。さらに、培養方法の特性を実験的に明らかにするとともに、理論に基づいた考察を行う。

第6章に本研究の結論をまとめる。

## 第2章

# 微生物培養の理論と実験

### 2.1 緒言

本章では微生物培養における理論，留意点および BC 産生菌の特性に関して述べる．それを踏まえて BC 産生菌の培養に関する予備実験を行う．

### 2.2 微生物培養の理論[43]

生物は酵素が多数連なった酵素ネットワークを形成することで，多様な生成物を生産する．1 基質による酵素反応のモデルでは，基質 S がまず酵素 E と共有結合によらない酵素-基質複合体 (enzyme-substrate complex: ES 複合体) という反応中間体を形成する．基質分子は酵素分子上の特定部位に結合し，反応中間体は酵素の触媒作用によって生成物 P を生成する．生成物は酵素分子表面から脱離し，酵素は再び反応に使用される．つまり，酵素は反応によって変化しない．これを式で表すと，



となる．ここで， $k_{+1} [s^{-1}]$  は基質と酵素の結合速度定数， $k_{-1} [M \cdot s^{-1}]$  は酵素-基質複合体の解離速度定数， $k_{+2} [M \cdot s^{-1}]$  は生成物の生成速度定数である．このモデルで多くの酵素反応速度の基質依存性を説明することができ，また 2 種類以上の基質や，多段階反応への応用も可能である．

式 (2.1) において，基質が酵素に比較して過剰に存在し，酵素分子中の基質結合部位が 1 つである場合，E と S から ES 複合体が生成する反応が反応開始後きわめて速やかに平衡状態に達すると仮定する．これは，迅速平衡法と呼ばれる．このとき，E，S，ES のモル濃度をそれぞれ  $C_E$ ， $C_S$  および  $C_{ES}$  とすると，

$$k_{+1}C_E C_S = k_{-1}C_{ES} \quad (2.2)$$

が成り立つ。この式から、

$$\frac{C_E C_S}{C_{ES}} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_{ES} \quad (2.3)$$

と  $K_{ES} [M]$  が定義される。  $K_{ES}$  は ES 複合体の解離定数であり、化学反応における平衡定数の逆数である。この定数は、ES 複合体の E と S への解離のしやすさを表す。

生成物の生成速度  $r [M \cdot s^{-1}]$  は ES の濃度に比例し、

$$r = k_{+2}C_{ES} \quad (2.4)$$

となる。ここで、  $k_{+2}$  は生成物の生成速度定数である。また、反応液中に存在する酵素の全濃度  $C_{E0}$  は一定であるため、

$$C_{E0} = C_E + C_{ES} \quad (2.5)$$

が成り立つ。式 (2.3) と式 (2.5) より、  $C_{ES}$  は次式で与えられる。

$$C_{ES} = \frac{C_{E0}C_S}{K_{ES} + C_S} \quad (2.6)$$

式 (2.6) を式 (2.4) に代入して、

$$r = \frac{k_{+2}C_{E0}C_S}{K_{ES} + C_S} = \frac{V_{\max}C_S}{K_{ES} + C_S} \quad (2.7)$$

$$V_{\max} = k_{+2}C_{E0} \quad (2.8)$$

となる。  $V_{\max} [M \cdot s^{-1}]$  は最大速度と呼ばれ、  $C_S$  が十分高いとき、  $r$  は最大速度に漸近する。この状態では反応速度は基質濃度によらなくなる。

また、酵素は種々の原因で活性を失うが、特に熱によって失活することが多い。酵素分子は活性があるかないかの悉無律に従うとされ、失活速度は未失活酵素の濃度  $C_E$  に比例し、一次の反応速度過程に従う。これは、未失活酵素の初期濃度を  $C_{E0}$  とすると以下の式で表される。

$$\frac{dC_E}{dt} = -k_d C_E \quad (2.9)$$

$$\ln \frac{C_E}{C_{E0}} = -k_d t \quad (2.10)$$

ここで,  $k_d$  [ $s^{-1}$ ]は失活速度定数である.  $k_d$ の温度依存性は, 次式で与えられる.

$$k_d = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (2.11)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger = E_a - RT - T\Delta S^\ddagger \quad (2.12)$$

ここで,  $k_B$ はボルツマン定数,  $h$ はプランク定数,  $R$ は気体定数である. また,  $\Delta G^\ddagger$ は失活の活性化自由エネルギー,  $\Delta H^\ddagger$ は失活の活性化エンタルピー,  $\Delta S^\ddagger$ は失活の活性化エントロピー,  $E_a$ は失活の活性化エネルギー,  $T$ は絶対温度である. 一般的に, 失活の活性化エネルギーは反応の活性化エネルギーの10倍から20倍大きいので, 失活速度は温度に強く依存する.

また, 酵素の活性と安定性はpHにも強い依存性を示す. これは酵素の活性部位が, カルボキシル基, アミノ基, イミダゾール基, スルフィド基, フェノール性ヒドロキシ基などのイオン性側鎖を有するアミノ酸から構成されるためである. アミノ酸残基の解離状態は, 活性部位の構造や基質の結合性に大きく影響を及ぼすため, pHにより酵素の触媒活性は著しく変化する. ここで, 酵素が  $E_{n+1}$ ,  $E_n$  および  $E_{n-1}$  の3状態をとるとし, 3種類の分子種をそれぞれ,  $(-COOH, -NH_3^+)$ ,  $(-COO^-, -NH_3^+)$ ,  $(-COO^-, -NH_2)$  とする. これら3種類の分子種とプロトンとの関係は, 以下の式で表せる.



$$K_{E1} = \frac{C_{E_n}}{C_{E_{n+1}}} [H^+] \quad (2.14)$$



$$K_{E2} = \frac{C_{E_{n-1}}}{C_{E_n}} [H^+] \quad (2.16)$$

ここで,  $[H^+]$ はプロトン濃度である. 迅速平衡法を用いることで, 反応速度  $r$ が以下のように

に求められる。

$$r = \frac{C_S k_{+2} C_{E0}}{K_m (1 + 10^{pK_{E1} - pH} + 10^{pH - pK_{E2}}) + C_S (1 + 10^{pK_{ES1} - pH} + 10^{pH - pK_{ES2}})} \quad (2.17)$$

ここで、 $pK_{E1} = -\log K_{E1}$ 、 $pK_{E2} = -\log K_{E2}$ 、 $pK_{ES1} = -\log K_{ES1}$ 、 $pK_{ES2} = -\log K_{ES2}$ である。式(2.17)からわかるように、酵素反応速度には pH の至適値が存在する (Figure 2.1)。

次に、多段階の酵素ネットワークにより代謝活動を行う微生物の増殖速度について考える。菌体の増殖は自己触媒反動的に起こると仮定できるため、増殖速度  $r_x$  は次式のように菌体濃度  $C_X$  に比例する。

$$r_x = \frac{dC_X}{dt} = \mu_r C_X \quad (2.18)$$

ここで、 $r_x$  [kg-乾燥菌体・m<sup>-3</sup>・s<sup>-1</sup>]は乾燥菌体質量基準の増殖速度、 $C_X$  [kg-乾燥菌体・m<sup>-3</sup>]は乾燥菌体質量濃度である。慣例的に、菌体質量には乾燥菌体質量が用いられる。式(2.18)を変形すると、次式が得られる。

$$\mu_r = \frac{1}{C_X} \left( \frac{dC_X}{dt} \right) \quad (2.19)$$

この式から、 $\mu_r$  [s<sup>-1</sup>]は単位乾燥菌体質量あたり、単位時間あたりの菌体量の増加を表すことがわかる。このことから $\mu_r$ は比増殖速度とよばれる。

菌体の質量が2倍になるのに要する時間 $t_d$  [s]を倍加時間とよぶ。一方、細胞分裂するのに要する平均的な時間 $t_g$  [s]を平均世代時間とよぶ。細胞が2分裂して増殖する菌では、倍加時間と平均世代時間は一致し、 $\mu_r$ と $t_d$ および $t_g$ の間には次の関係式が成り立つ。

$$t_d = t_g = \frac{\ln 2}{\mu_r} \quad (2.20)$$

比増殖速度 $\mu_r$ や倍加時間 $t_d$ は菌の種類および培地組成、細胞濃度、温度、pHなどの培養条件により異なる値をとる。一般的に、遺伝情報が多い高等な生物の細胞ほど $\mu_r$ は小さく、逆に $t_d$ は大きい値となる。先行研究において、BC産生菌の倍加時間は1.5-8時間であると報告されている[44]。

比増殖速度と基質成分濃度との関係を表す式として、次式で表されるMonodの式が一般的によく用いられる。

$$\mu_r = \frac{\mu_{r,\max} C_S}{K_S + C_S} \quad (2.21)$$



ここで、 $K_s$ は特定の基質成分Sの飽和定数であり、最大比増殖速度 $\mu_{r, \max}$ の1/2を与える基質濃度と定義される。このとき、S以外の成分は培地中に十分量に存在すると仮定し、基質Sを制限基質とよぶ。なお、式(2.21)は式(2.7)のミカエリス・メンテン式に似ているが、前者は経験式である。

式(2.18)のように、菌体の増殖速度が菌体濃度に対して一次反応であると仮定できるとき、時間 $t$ における菌体濃度 $C_x$ は次式のようになる。

$$C_x = C_{x0} \exp(\mu_r t) \quad (2.22)$$

ここで、 $C_{x0}$ は初期の菌体濃度であり、式(2.22)は菌体濃度の時間変化が指数関数的に増加することを意味する。環境の制約がない条件の下では、実際に菌体の増殖曲線は指数関数を描く。しかし、回分培養では菌体の増殖に伴い、基質成分の減少やpHの変化が起こるため、菌体の増殖曲線は単純な指数関数とはならない。

誘導期 (Lag phase) は細胞分裂が始まるまでの準備期間で、増殖に必要なRNAや酵素などが菌体内で合成される。細胞分裂はみられず、菌数は一定であるが、菌体質量は増加する。この期間の長さは培養条件や接種する菌体の菌齢によって変わる。すなわち、対数増殖期の菌体を接種すると短くなり、静止期の菌体を接種すると長くなる。

細胞が分裂を開始すると、増殖曲線は式(2.22)のような指数関数を描く。この期間は対数増殖期 (Log phase) とよばれ、制限基質の濃度 $C_s$ が十分存在し、 $K_s \ll C_s$ が成立している。

菌体の増殖に伴い、制限基質の濃度は次式に伴って減少する。

$$\frac{dC_s}{dt} = -\frac{(dC_x/dt)}{Y_{x/s}} \quad (2.23)$$

ここで、 $Y_{x/s}$ は制限基質の質量基準細胞収率を表す。細胞収率とは、投入した基質量に対して得られる菌体質量の割合で、次式により表される。

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta W_x}{\Delta W_s} \quad (2.24)$$

ここで、 $\Delta W_s$ は基質の消費量、 $\Delta W_x$ は菌体の生成量である。Monodの式(2.21)が示すとおり、基質濃度の減少に伴い、比増殖速度が減少する。この期間が減速期 (Decelerating phase) であり、増殖速度の減少は制限基質濃度の減少のみならず、有機酸やアルコールといった代謝産物による増殖の阻害や、それらの蓄積によるpHの変化も要因となる。

減速期を過ぎると、菌体濃度が変化しなくなる。この期間は静止期 (Stationary phase) とよばれる。この期間では、菌体の増殖速度と死滅速度が平衡となっており、次式が成り立つ。

$$\frac{dC_X}{dt} = \left( \frac{\mu_r C_S}{K_S + C_S} \right) C_X - k_d C_X \quad (2.25)$$

ここで、 $k_d$ は死滅速度定数である。上式において、 $dC_X/dt = 0$ の状態が静止期となる。

静止期がしばらく続くと、式 (2.25) における第2項が大きくなり、生菌体数の減少が始まる。この期間は死滅期 (Decline phase) とよばれ、菌体濃度は対数的に減少する。しかし、一般的に細胞の死亡速度は、対数増殖期における増殖速度よりもはるかに遅い。

次に、基質の消費速度について考える。この速度は、基質の細胞内への取り込み速度と、細胞内での酵素反応速度により決定されるが、前者の速度過程が律速段階となる場合が多い。基質が細胞膜および細胞壁を通過し、細胞内へ取り込まれる機構として、単純拡散による受動輸送、細胞膜の担体やチャネルによる促進拡散、およびエネルギー消費を伴う能動輸送の3つが存在する。膜透過速度や細胞内での代謝速度を考慮し、基質の消費速度を定量的に取り扱うことは困難であるため、基質消費速度  $r_s = -dC_S/dt$  は次式で示すように、細胞収率を増殖速度  $r_X$  と関係付けた形で表現される。

$$r_s = \frac{r_X}{Y_{X/S}} \quad (2.26)$$

式 (2.26) において、菌体の維持代謝に消費される基質量も考慮し、菌体濃度に対する基質消費速度  $r_r$  は次式のようになる。

$$r_r = \frac{r_X}{Y_{X/S}^*} + m C_X \quad (2.27)$$

ここで、 $Y_{X/S}^*$  は増殖に消費される基質量から算出される細胞収率、 $m$  は維持定数を表しており、 $r_r$  は比消費速度とよばれる。

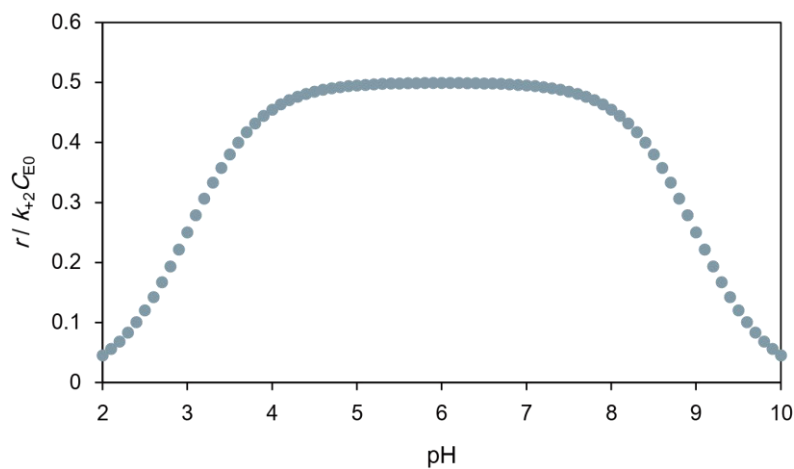


Figure 2.1 Dependency of the reaction rate on pH, where  $pK_{E1} = pK_{ES1} = 3$ ,  $pK_{E2} = pK_{ES2} = 9$ ,  $K_m = 10$ ,  $C_s = 10$  in Eq. (2.17).

## 2.3 BC 産生菌

### 2.3.1 特性

セルロースは、植物のみならず細菌や菌類、粘菌類、藻類、ホヤなどさまざまな生物から合成される地球上最大の再生可能バイオマスである。そうしたセルロースのうち、細菌によって合成されるセルロースはBCと呼ばれ、特異な性質からさまざまな応用が期待されている。BCを産生する細菌の1つで、本研究で用いた*Komagitaeibacter xylinus* は、通性好気性のグラム陰性菌であり、大きさが幅0.5-1  $\mu\text{m}$ 、長軸方向の長さ2-10  $\mu\text{m}$ の棍菌である。この細菌は嫌気的環境下では、原形質膜たんぱく質のエタノール酸化能により、アルコールから酢酸を生成する。一方、好気的環境下ではグルコースをウリジン5'-二リン酸グルコース (UDPグルコース) に変換し、細胞膜上の顆粒複合体 (ターミナルコンプレックス: TC) によってセルロースを合成すると同時に菌体外へ排出する (Figure 2.2)。また、エタノールを添加することにより、BCの生成量を大幅に増加することができる。これは、エタノールが酢酸塩 (Acetate) に変換され、TCA回路を介して最終的に二酸化炭素、水およびATPが生成されるが、このATPがペントース-リン酸経路 (PP経路) を阻害するためであると考えられている[45]。つまり、菌体内のATPの増加がグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの活性を50%以上減らし、PP経路が阻害されることによりセルロース合成反応が亢進する。セルロース合成には酸素消費を要するため、静地培養ではBCは酸素濃度の高い気液界面で生成される。

セルロースの合成酵素遺伝子オペロンは AxCesA, AxCesB, AxCesC および AxCesD で構成されている。AxCesA は、UDP グルコースから (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -グルカンセルロースを合成する触媒活性を有する 4- $\beta$ -グルコシルトランスフェラーゼを発現させる。AxCesB は環状グアニル酸が結合することにより、AxCesA の反応を活性化させる制御たんぱく質であるとされ、AxCesC はグルカン鎖排出のための孔形成に関わるとされる。また AxCesD はセルロースの排出、結晶化の役割を担っていると推定されている。これら 4 つの遺伝子にコードされた 4 つのポリペプチドによる複合体が TC サブユニットとなって集合し、TC が形成される。原核生物 TC は 12-70 個のサブユニットが細胞膜中で直線状に並び、真核生物の TC とは異なる形態をとる。各 TC サブユニットから生合成されたセルロース分子鎖が自己集合して束になって直径 1.5 nm のファイバができる。これをサブエレメンタリーフィブリルと呼ぶ。このサブエレメンタリーフィブリルが数本集まって幅約 4 nm のマイクロフィブリルとなり、さらにマイクロフィブリルが集合して幅約 40-60 nm、厚み 10 nm のリボン状のセルロースナノファイバとなる。細菌はファイバ噴出の際、長軸の周りを右回りに自己回転しながら、噴出の反作用によって噴出方向と逆方向に 25 $^{\circ}\text{C}$ で約 2  $\mu\text{m}/\text{min}$  の速度で移動する[46]。この過程で産生されたセルロースナノファイバはねじれ、リボン状となる。

BCを産生する生物学的意義はいまだ明らかになっていないが、仮説がいくつか唱えられている。一つは、好気性の菌であることから呼吸の目的で、高酸素濃度の気液界面に自身を



### 2.3.2 培養実験

BCの生成量は、大量培養した際のコストに大きな影響をもつため、最適なグルコース添加量を決定することが重要である。そこで、Table 2.1の組成で培地を調製し、グルコース添加量  $x$  と BC 生産量の関係を実験的に評価した。ここで溶液1はアミノ酸、溶液2は糖を主成分としており、これらを混合して加熱滅菌を施すと、還元糖とアミノ酸などの1級アミンが縮合してシッフ塩基を形成し、褐色メラノイジンが生成する。これはメイラード反応と呼ばれ、還元糖やアミノ酸濃度の増加、加熱温度および時間の増加、pHの増加などによって褐変が強くなり、細菌の基質濃度が低下する。これを避けるため、溶液1と2を別々に加熱滅菌処理し、これらを等量で混合することにより培養液を調製した。また、揮発性のエタノールは加熱滅菌によって溶液外に散逸してしまうため、シリンジフィルタを用いて除菌したものを溶液2に加えた。なお、使用した試薬は全て和光純薬工業株式会社より購入した。培養は直径90 mm、高さ15 mmのプラスチックシャーレ (CHIC シャーレ、アズワン株式会社) に10 mLの培地を入れ、菌懸濁液 ( $4 \times 10^7$  cells/mL) を1 mL加えることで行った。温度30°Cの恒温槽内で2日間培養した後、得られたBCの湿潤質量を測定することでBC生成量を評価した。結果をFigure 2.3に示す。BC生産量はグルコース濃度が0.5 M付近で極大値をとり、それを越える濃度では生産量が減少していることがわかる。グルコース濃度が0.5 M以下の領域においては、グルコース濃度の増加に伴ってMonodの式(2.21)における $C_s$ が増加し、BCの生成量が増加したものと思われる。この傾向は、先行研究においても示されている[50]。一方、グルコース濃度0.5 M以上の領域においては、グルコース濃度が増えるにしたがって、BC生成量が減少している。式(2.21)を考えると、基質濃度がある一定値を越えるとBC生成量は変化しなくなるはずであるが、これは高濃度のグルコースによる高浸透圧環境がBC産生菌の増殖を阻害したためであると考えられる。すなわち、細胞内の水が細胞外へと移動し、同時に生育に必要なナトリウムやカリウムなどの無機イオンが流出したことで、BCの生成速度が低下した可能性が挙げられる。この生育阻害現象は、食品分野における糖蔵として用いられている技術である。

次に、Table 2.1においてグルコース量を200 gとした培地を用いて、*K. xylinus*の増殖曲線を作成した。培養は、培地20 mLを含んだフラスコに*K. xylinus*を植菌することで行った。静地培養では菌が産生したBC膜に付着し、正確に菌濃度を評価することが難しいため、マグネットスターラーによる攪拌培養にて培養を行った。なお、培養温度は30°Cとした。また、菌濃度の計測には菌数計算盤 (C-Chip DHC-N01, アズワン株式会社) を用いた。誘導期の長さの違いを確認するため、指数増殖期 (Log phase)、減速期 (Decelerating phase)、静止期 (Stationary phase) それぞれの菌を植菌し、菌濃度の変化を調べた。まず、静止期の菌20  $\mu$ Lを植菌して培養を開始し、68時間後に20  $\mu$ L培地を採取、これを新たな培地に植菌することで減速期の細菌を培養した。次に、減速期の細菌の培養開始から12時間後に20  $\mu$ L培地を採取、これを新たな培地に植菌することで対数増殖期の細菌を培養した。結果をFigure

2.4 に示す. この図からわかるように, どの期間から培養した細菌も, 2.2 で述べたように誘導期, 対数増殖期, 減速期を経て増殖していることがわかる. また, 静止期から培養を開始した細菌は誘導期が一番長く, 減速期から培養を開始した細菌の誘導期が一番短かった. 静止期の細菌は, 細胞分裂に必要な物質の合成が停止した状態であるため, 誘導期が一番長くなったと考えられる. また, 減速期から培養を開始した細菌は, 対数増殖期から培養を開始した細菌に比べて初期濃度が高かったため (減速期は  $1.0 \times 10^5$  cells/mL, 対数増殖期は  $4.0 \times 10^3$  cells/mL), より早く静止期に達したものと思われる.

Table 2.1 Composition of culture medium for *K. xylinus*.

Solution 1		Solution 2	
Component	Amount	Component	Amount
Polypepton	10 g	Glucose	x g
Yeast extract	10 g	Mannitol	10 g
DI water	1 L	MgSO <sub>4</sub> 10H <sub>2</sub> O	2 g
		Ethanol	10 mL
		DI water	1 L

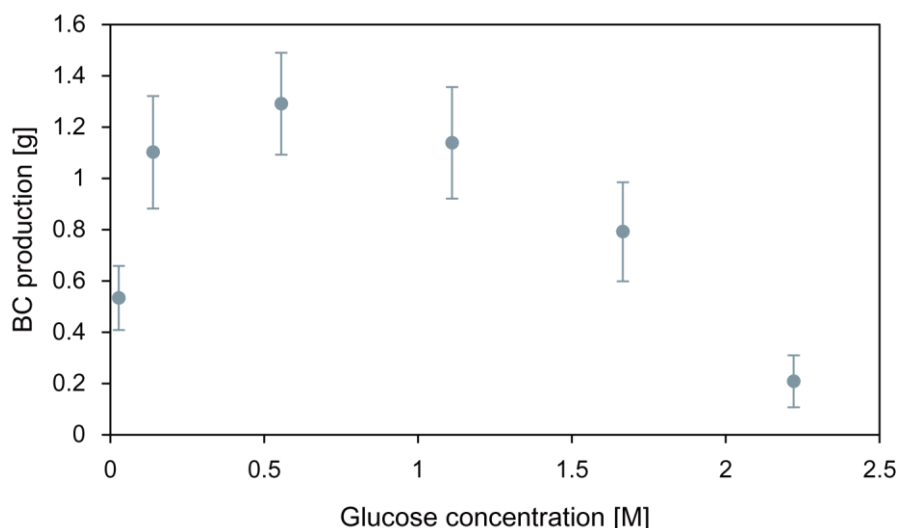


Figure 2.3 BC production as a function of glucose concentration. The weight of BC was measured in wet state. Error bars represent the standard deviations;  $n = 3$ .

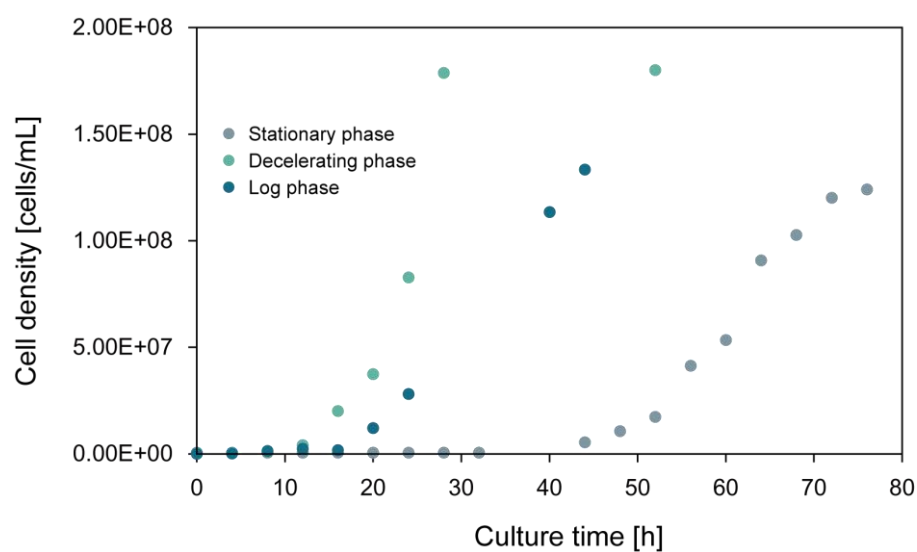


Figure 2.4 Growth curve of *K. xylinus* inoculated from various phase.

## 2.4 結言

本章では、微生物培養の理論と BC 産生菌の特性を示し、本研究全体に関わる基礎的な知識について述べた。加えて、BC 産生菌の培養実験を行い、用いた菌株の増殖特性を明らかにした。培地に加えるグルコース量には至適値が存在することを示し、その濃度はおよそ 0.5 M であることを確認した。また、異なる増殖期にある BC 産生菌を、培地に植菌した際の増殖速度の違いを評価した。その結果、減速期、対数増殖期、静止期の順で増殖速度が高いことがわかった。

## 第3章

# 微細構造を有する BC 膜の成形技術

### 3.1 緒言

ナノメートルオーダーの直径をもつ繊維で構成された材料はナノファイバ材料と呼ばれ、ECM との構造的類似性のために、特に組織工学に応用されている[53-55]。ナノメートルオーダーの繊維に加え、マイクロメートルオーダーの足場構造が接着細胞の機能と挙動に大きな影響を与える。したがって、生体内環境を模倣する上で、ナノファイバ材料から微細なトポグラフィを形成する技術は極めて重要である[38-42]。例えば、Martins らはポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン)の前駆体溶液を導電性メッシュコレクタに電界紡糸して、微細構造を有するナノファイバ膜 (P-NFM) を作製した[56]。平坦膜 (PCL NFM) に播種されたヒト骨髄間葉系幹細胞は明確なパターン形成を示さなかったが、P-NFM に播種された細胞は接着性を示し、パターンに沿って広がった。また、骨組織特異的な転写産物であるアルカリホスファターゼ、Runx2、および Osterix の転写量も、P-NFM を用いた培養では有意に多く、マクロな構造が分化を促進することが示された。

ナノファイバ膜上にマイクロメートルオーダーの構造を形成するためには、エレクトロスピニング法が主に用いられてきた[57-63]。この技術は、表面に微細構造を有する導電性コレクタを使用する方法と、光架橋可能材料を電界紡糸した後に、膜をフォトリソグラフィで微細パターン化する方法との大きく2つに分けられる。

しかしながら、これらの方法はすべて、歩留まり悪さから製造コストが高いという欠点がある。また、電界紡糸法では隣接するジェット同士の干渉や、低流量といった問題もしばしば生じる[64]。ノズルなし電界紡糸法[65-67]やマルチジェット電界紡糸法[68]といった、生産性を向上させる研究例はあるものの、ナノファイバ材料の産業利用は限られた分野にとどまっている。

そこで、本章では簡便に微細構造を有する BC 膜を成形可能なプロセスを提案し、プロセスの評価を行う。



## 3.2 プロセス概要

Figure 3.1 にプロセスを示す。まず、微細構造を有する PDMS の膜を *K. xylinus* の培地表面上に浮遊させる。PDMS は疎水性であるため、密度は水よりも高い ( $1.11 \text{ g/cm}^3$ ) が、培地表面に安定的に浮遊する。

次に、培地内に *K. xylinus* の懸濁液を加えて静地培養する。PDMS はガス透過率が高いため[69]、その膜を通して酸素が *K. xylinus* に供給される。したがって、*K. xylinus* は PDMS 膜上で BC を生成し、PDMS の微細構造パターンと反転した微細構造が BC 膜上に転写される。

本プロセスは、容易にスケールアップが可能で、現在産業的に用いられる BC 生産プロセスと組み合わせることもできる。また、PDMS 膜のマスターモールドは何度でも繰り返し使用することができ、経済性も非常に高い。

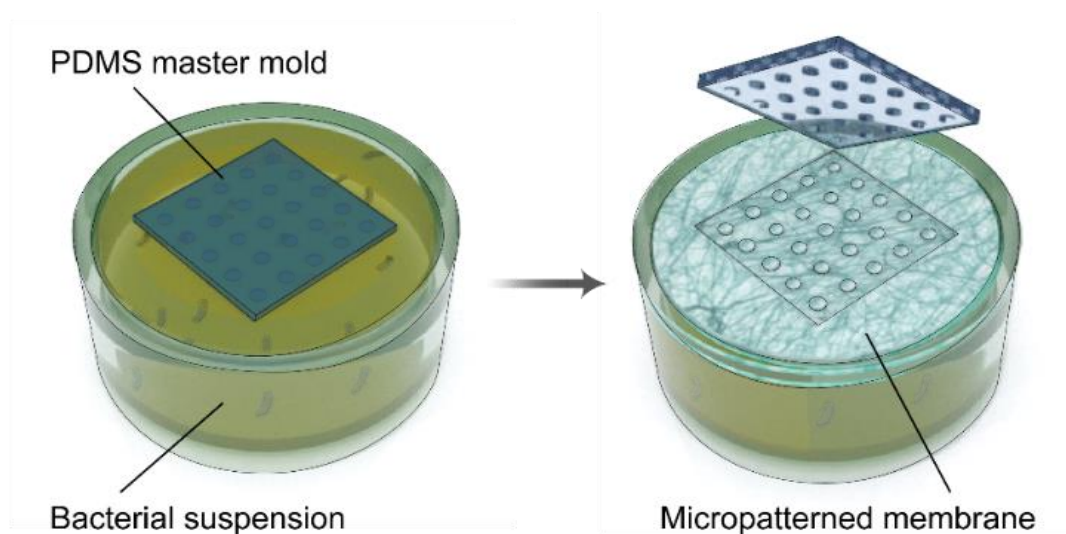


Figure 3.1 Schematic illustration of the process for micropatterning BC film. PDMS master molds with micrometer-range geometries are placed onto the culture medium with the bacteria. PDMS is highly gas permeable, allowing oxygen to be supplied with bacteria from atmosphere for the production of BC. Subsequently, by consuming oxygen and nutrition, the bacteria produce cellulosic nanofibers along with the surface of the PDMS master mold during the bacterial locomotion, resulting in the micropatterned BC film.

## 3.3 実験

### 3.3.1 マスターモールドの作製

以下の手順により，フォトリソグラフィ技術によってPDMS鋳型を製作した。

#### (1) スピンコート

フォトレジストとして，エポキシ樹脂であるSU-8を使用した。SU-8には粘性に応じて様々なグレードが存在し，適する膜厚もそれに依りて異なる。本実験ではSU-8 10およびSU-8 3050を用いた（ともに日本化薬株式会社）。

まず，高圧窒素ガスにより洗浄したガラス基板（Micro slide Glass,  $76 \times 52 \times 1.1 \text{ mm}^3$ , 松浪硝子工業株式会社）をスピンのステージ上に配置し，基板上にレジストを塗布した。スピンコート後，基板をホットプレート上（ $65^\circ\text{C}$ または $100^\circ\text{C}$ ）で加熱し，レジスト中の溶媒を蒸発させた。加熱後，基板を室温下で10分間放置して冷却した。これにより，ガラス基板とレジストの線膨張率の違いから，レジストが基板から剥離することを防ぐことができる。

#### (2) 露光

フォトマスクとレジストを接触させた状態で，マスクアライナ（EMA-400, ユニオン光学株式会社）を用いて紫外線を照射した。露光に使用した紫外線の波長は405 nm, エネルギー密度は $20 \text{ mW/cm}^2$ であった。紫外線が照射された領域は，発生した酸により高分子鎖が相互に架橋される。紫外線の照射後，基板をホットプレート上（ $65^\circ\text{C}$ または $100^\circ\text{C}$ ）で加熱し，架橋反応を促進した。

#### (3) 現像

露光処理した基板を，現像液であるSU-8 Developer（日本化薬株式会社）内に配置し，レジストの未架橋領域を溶解させた。この際，溶解したSU-8が基板表面に留まらないよう，振とう機（ROTARY SHAKER NX-20, 株式会社日伸理化）の上で振とうさせながら現像を行った。その後，現像液から基板を取り出し，高圧窒素ガスで基板を洗浄することで，微細構造体をガラス基板上に形成した。

次に，製作した微細構造をPDMS上に転写した。PDMSのプレポリマは表面エネルギーが小さいため，微細な形状を正確に転写することができる。まず，PDMS（sylgard 184, 東レ・ダウコーニング株式会社）の主剤と重合剤を体積比10:1で混合し，真空デシケーター内に30分放置することで，プレポリマ内の泡を除去した。次に，プレポリマをシリンジにてSU-8微細構造上に4 ml滴下し，プレポリマが基板全体に広がったのちにスピンのステージ上で行った。

その後、基板を100°Cのホットプレート上で約1時間加熱し、重合を促進した。重合が終了したPDMSを、医療用メスにより切断し、微細構造を有するPDMS膜を製作した。

本実験では、フォトマスクとしてFigure 3.2に示した2種類のパターンを使用した。なお、このフォトマスクの製作は東京プロセスサービスに委託した。ドットパターンマスク、ラインパターンマスクを使用した際のプロセス条件をそれぞれTable 3.1, Table 3.2に示す。製作した構造体の高さをレーザ顕微鏡 (VK-X100, 株式会社キーエンス) により測定した。その結果、ドットのパターンでは $52.15 \pm 1.84 \mu\text{m}$ , ラインパターンでは,  $4.28 \pm 0.08 \mu\text{m}$ であった。次に、PDMS膜製作におけるプロセス条件をTable 3.3に示す。また、膜厚と回転数 $r$ の関係をFig. 3.5に示す。スピナーコーティングにおける膜厚は、初期液膜の厚さが不均一であっても回転にするにつれて均一になる[70]。Meyerhoferは粘性流と蒸発の効果を考慮し、膜厚 $h$ を表す以下の式を導いた[71]。

$$h = x \left( \frac{e}{2(1-x)K} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (3.1)$$

$$e = C\sqrt{\omega} \quad (3.2)$$

$$K = \frac{\rho\omega^2}{3\eta} \quad (3.3)$$

ここで、 $x$  は溶液中の有効固体成分、 $e$  と $K$  はそれぞれ蒸発定数と流れ定数、 $\omega$  は回転数、 $\rho$  は液体の密度、 $\eta$  は粘性率、 $C$  は気相流れに関する定数である。多くの実験例から膜厚が $\omega$ の $-1/2$ 乗に比例することがわかり、多くの実験例は式(3.1)とよく一致するが、液体の揮発性により乗数は異なる値となることがある[72]。したがって、以下の式を用いて膜厚 $h$ を実験的に求めることができる。

$$h = \left( \frac{\omega}{k} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (3.4)$$

ここで、 $k$  は樹脂や湿度などの要因に起因する定数である。式 (3.4) を用いてフィッティングした結果をFigure 3.3に実線で示す。これにより、回転数を変化させることでPDMS膜の膜厚を制御できるが、膜厚が $200 \mu\text{m}$ よりも薄いPDMS膜を基板から剥離させる際、PDMSが微細構造へ付着し、膜が破損した。したがって、BC膜の製作には膜厚 $200 \mu\text{m}$ 以上のものを用いた。

Figure 3.4に、ラインパターンのフォトマスクを用いて製作したPDMS膜の微細構造を示す。この図からわかるように、線幅 $2.5 \mu\text{m}$ 以下の凹構造は製作できなかった。また、凸構造については、幅の測定値が $2.5 \mu\text{m}$ よりも大きかった ( $4.25 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ) ため、パターン幅 $5 \mu\text{m}$ 以上の膜を、BC膜の製作に使用した。

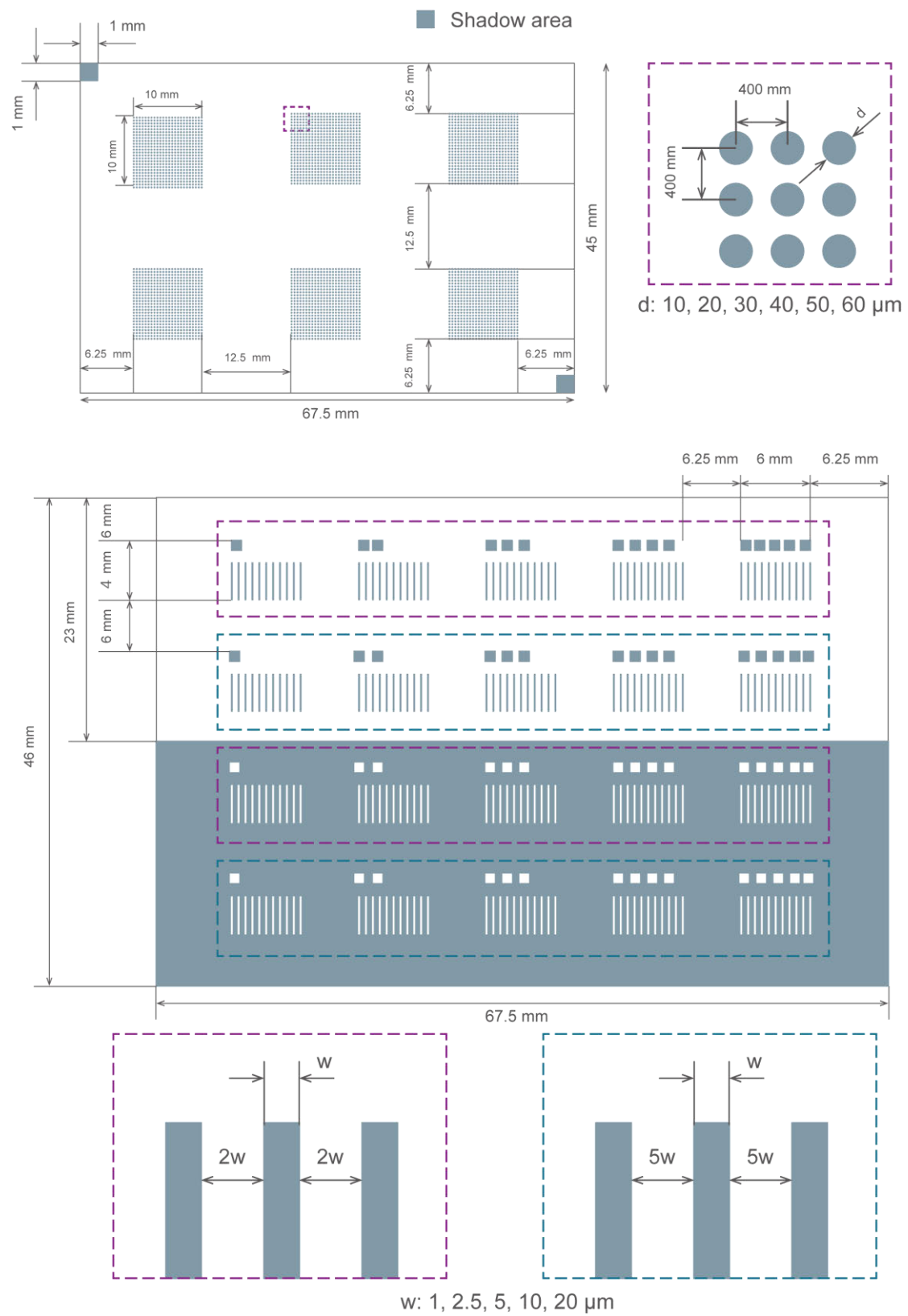


Figure 3.2 Photomask design for the dot pattern (top) and the line pattern (bottom).

Table 3.1 Condition of photolithography for the dot pattern.

Procedure	Condition
Slope	5 s
1st Spin	500 rpm, 5 s
Slope	7 s
2nd Spin	2675 rpm, 30 s
Soft Bake@100°C	15 min
Cool@RT	10 min
Exposure	20 s
Post Exposure Bake@65°C	1 min
Post Exposure Bake@100°C	5 min
Cool@RT	10 min
Development	8 min

Table 3.2 Condition of photolithography for the line pattern.

Procedure	Condition
Slope	5 s
1st Spin	500 rpm, 5 s
Slope	12 s
2nd Spin	4000 rpm, 30 s
Soft Bake@65°C	2 min
Soft Bake@100°C	5 min
Cool@RT	10 min
Exposure	6 s × 3 times (10 s interval)
Post Exposure Bake@65°C	1 min
Post Exposure Bake@100°C	2 min
Cool@RT	10 min
Development	2 min

Table 3.3 Condition of spin coating process for the PDMS master mold.

Procedure	Condition
Slope	5 s
1st Spin	200 rpm, 5 s
Slope	2 s
2nd Spin	$r$ rpm, 30 s

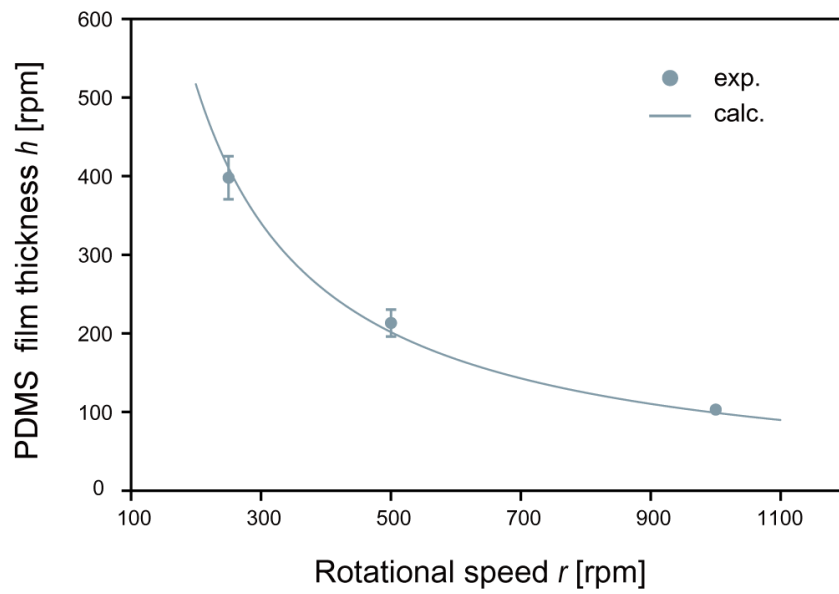


Figure 3.3 Thickness of PDMS master mold as a function of rotational speed in the spin coating process. Fitting curve was calculated by using the Eq. (3.4). Error bars represent standard deviation; sample size  $n = 5$ .

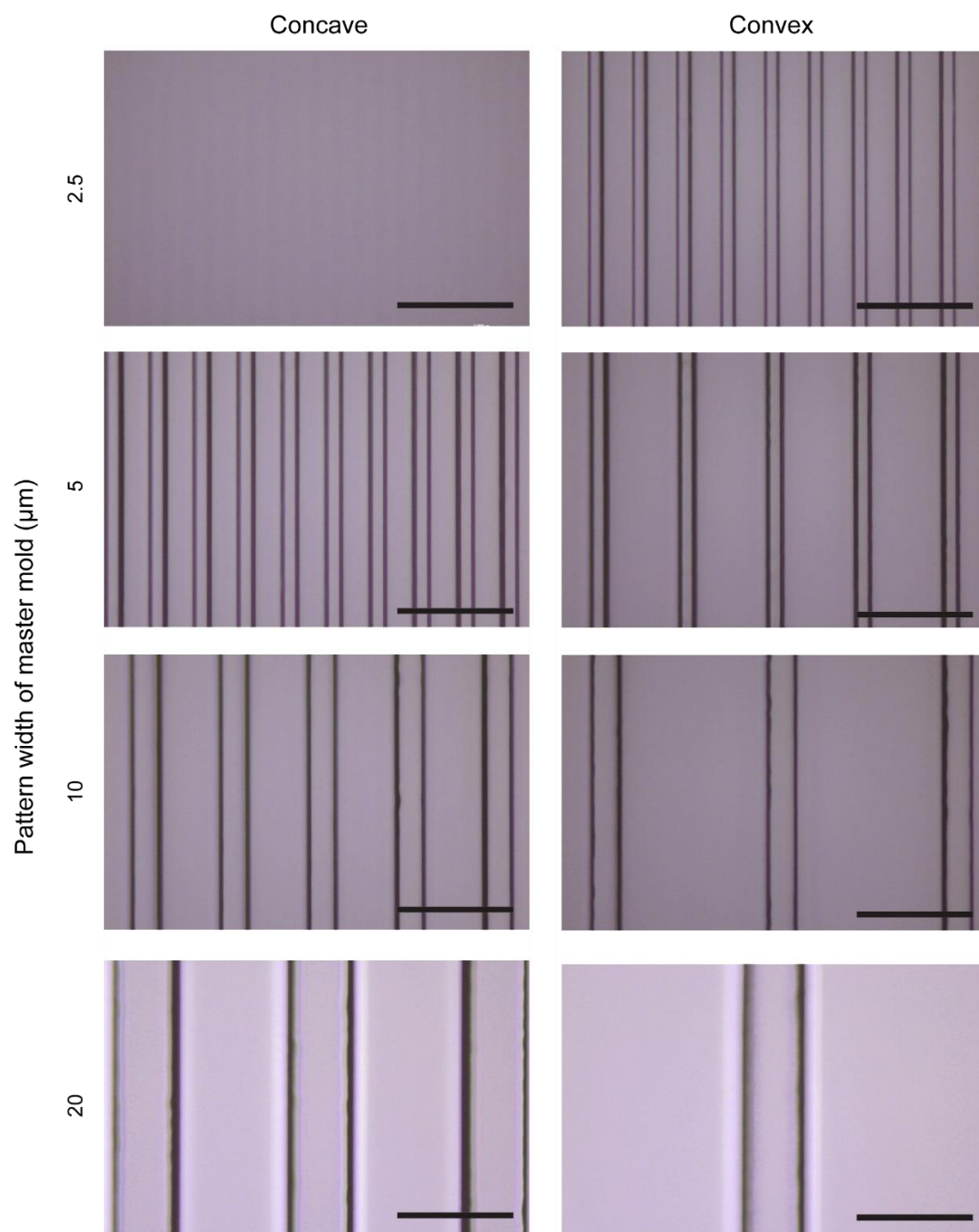


Figure 3.4 Micrographs of the micropatterned PDMS master mold film with line-pattern. The images show the concave (left) and convex (right) pattern. Scale bars, 40  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2 微細構造を有する BC 膜の成形

3.3.1 で作製した PDMS 膜を用いることで, Figure 3.5 に示すような微細構造を有する BC 膜を製作することができる. 培養のプロセスはまず作製した PDMS 膜を *K. xylinus* の液体培地表面に浮遊させ, *K. xylinus* の懸濁液 (菌濃度:  $2.0 \times 10^8$  cells/mL) を 1 mL 培地中に加えることで *K. xylinus* を培養した. なお, 培地は Table 2.1 に示した溶液 1 と 2 を等量混合したものを 15 mL 使用した. 培養容器には, ポリスチレン製の EOG 滅菌済みシャーレ (CHIC シャーレ, アズワン株式会社, 直径 90 mm, 高さ 15 mm) を使用し,  $30^\circ\text{C}$  に設定された恒温槽内で 3 日以上培養を行った. Figure 3.5 から, BC のセルロースナノファイバネットワーク構造が保たれていることがわかる. BC 膜は培養容器の気液表面全体を覆うようにして形成されるが, 興味深いことに PDMS 膜の縁部分では BC 膜の厚さが  $10 \mu\text{m}$  以下と非常に薄くなっていた.

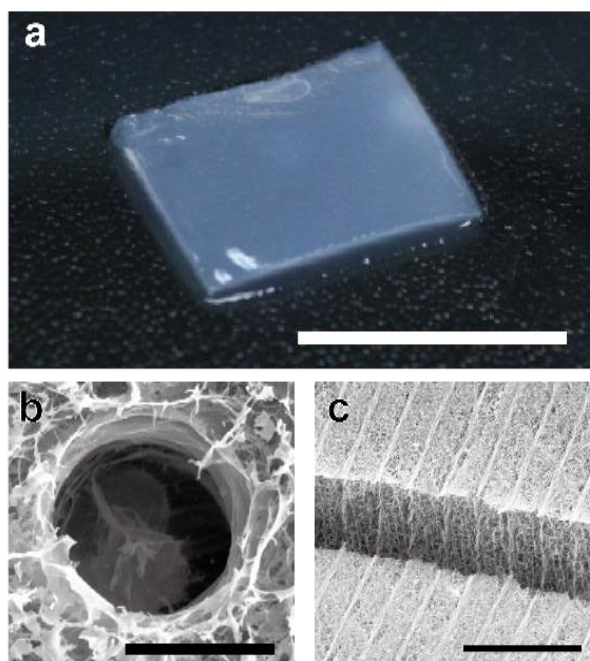


Figure 3.5 Images of the micropatterned BC film. (a) Photograph of the micropatterned BC film. (b) SEM image of the micropatterned BC film with concave pattern. (c) SEM image at the cross section of the line-patterned BC film. Scale bars, 20 mm for (a),  $30 \mu\text{m}$  for (b), and  $50 \mu\text{m}$  for (c).



### 3.3.3 最小構造の評価

本プロセスを産業利用する上で、成形可能な構造の最小サイズは重要な指標である。*K. xylinus* の大きさが数  $\mu\text{m}$  であるため、製作可能な最小構造の存在が予測される。そこで、様々なサイズの構造を有する BC 膜を作製し、その構造サイズについて調べた。

まず、ドットパターンのフォトマスク (Figure 3.2 (上)) を使用して作製した PDMS 膜から BC 膜を作製した。製作された BC 膜の光学顕微鏡画像を Figure 3.6 に示す。この図から、PDMS 膜の微細構造が正確に転写されていることがわかる。この転写の正確性を定量的に評価するため、倒立顕微鏡から得た画像データをもとに、円形微細構造の直径を測定した。なお、測定には ImageJ を使用した。結果を Figure 3.7 に示す。結果からわかるように、微細構造の直径に依存することなく、また凹構造、凸構造どちらのパターンも、BC 上に形成された全ての微細構造体のサイズはフォトマスクの設計値と等しくなった。このことから、 $20\ \mu\text{m}$  までの微細構造体を BC 膜上に転写することが可能であることがわかった。

次に、ラインパターンのフォトマスク (Figure 3.2 (下)) を用いて作製した PDMS 膜から BC 膜を作製した。製作された BC 膜の電子顕微鏡画像を Figure 3.8 に示す。なお、電子顕微鏡画像の取得に際し、製作した BC 膜を凍結乾燥することでサンプルを作製した。ここで、BC 膜をまず  $1\ \text{M NaOH}$  溶液 (和光純薬株式会社)、次いで脱イオン水で洗浄したのち、 $5.1\ \text{mM}$  マルトース溶液に 1 晩浸漬した。マルトース溶液は、マルトース分子が BC のセルロースファイバ間に入り込み、乾燥した際ファイバ同士が凝集するのを抑制する効果がある。このプロセスを経た BC 膜を液体窒素にて凍結し、凍結乾燥機 (FD-1000, 東京理化学器械株式会社) にて乾燥した。これにオスミウムをコートし、サンプルを作製した。ドットパターンのときと同様に、転写の正確性を定量的に評価するため、形成された微細構造体の線幅を測定した。結果を Figure 3.9 に示す。この結果からわかるように、BC 上に形成された全ての微細構造体のサイズはフォトマスクの設計値と等しくなった。したがって、本プロセスは最低でも  $2.5\ \mu\text{m}$  の構造を形成できることがわかった。

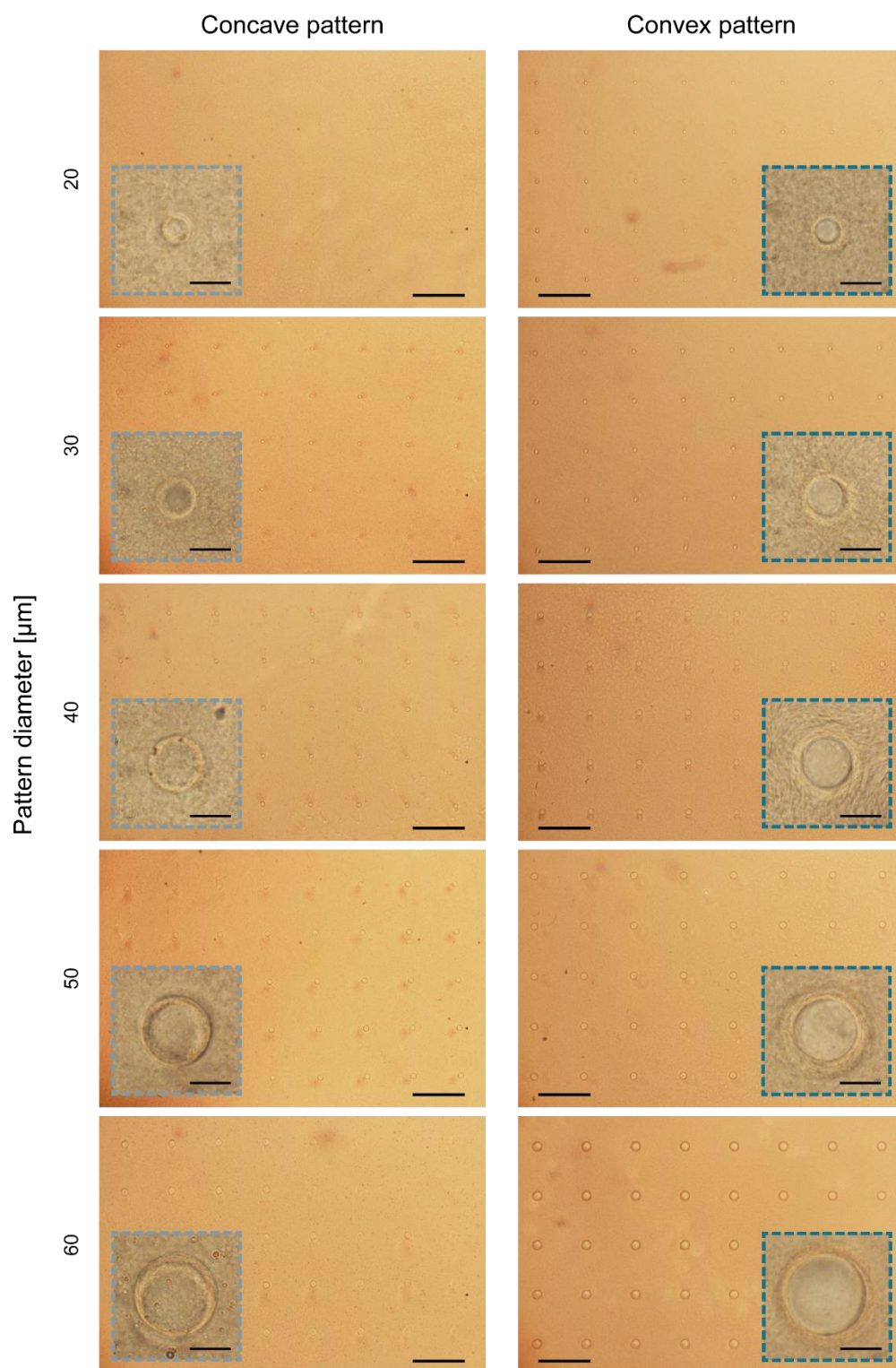


Figure 3.6 Micrographs of the micropatterned BC film with dot patterns. The pattern diameter means the design value for the photomask to prepare the replica mold for the PDMS master mold. Scale bars, 400  $\mu\text{m}$  for large images and 30  $\mu\text{m}$  for insets.

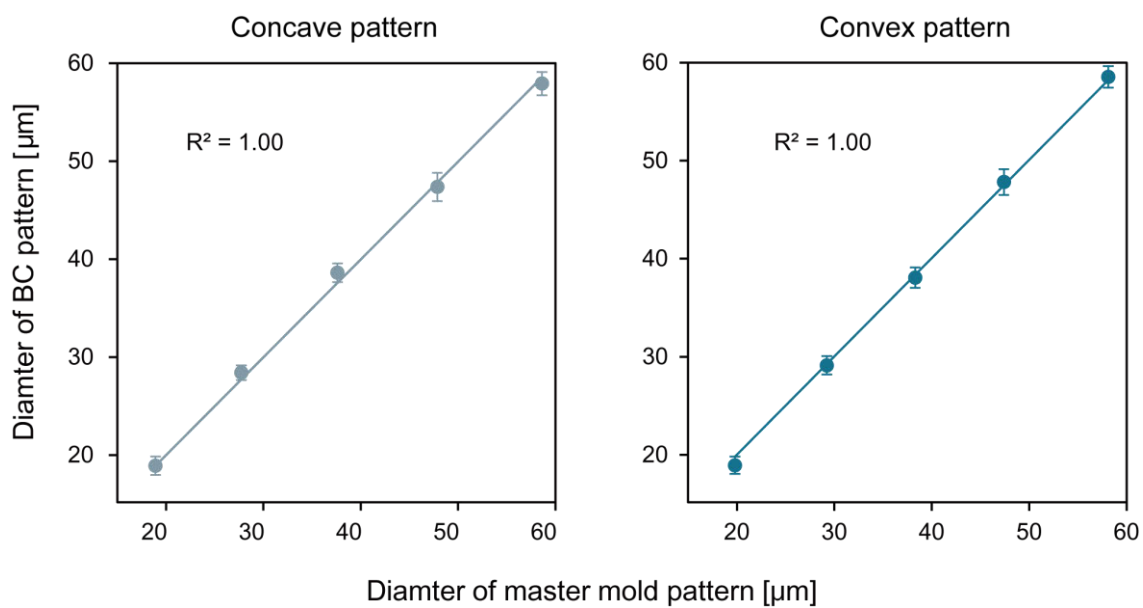


Figure 3.7 Diameters of the dot patterns on the PDMS master molds and the BC films with concave pattern (left) and convex pattern (right). Error bars show standard deviation; sample size  $n = 30$ .

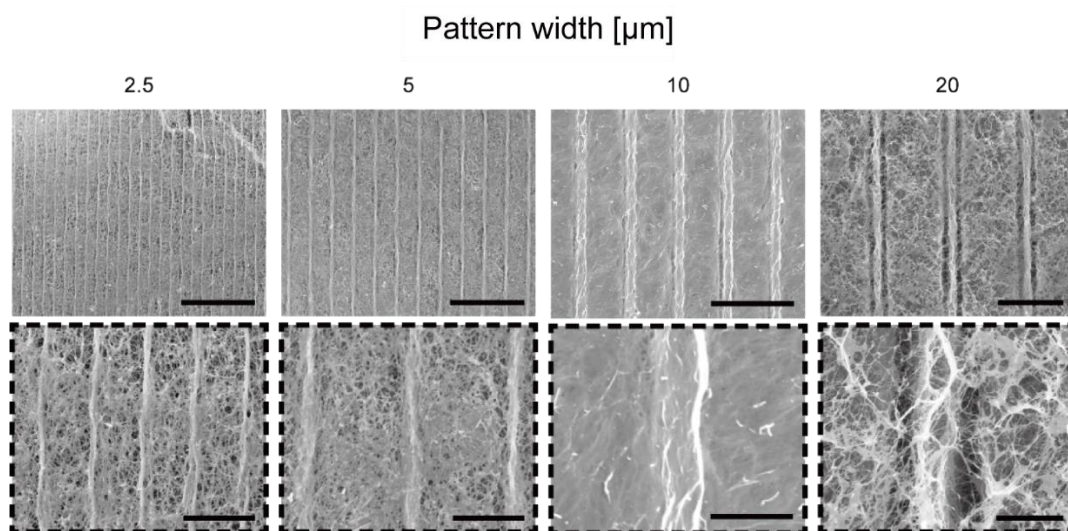


Figure 3.8 SEM images of the micropatterned BC film with line patterns. The images in right row are enlarged views of the left images. The pattern width means the design value for the photomask to prepare the replica mold for the PDMS master mold. Scale bars, 100 μm for the upper images and 20 μm for the lower images.

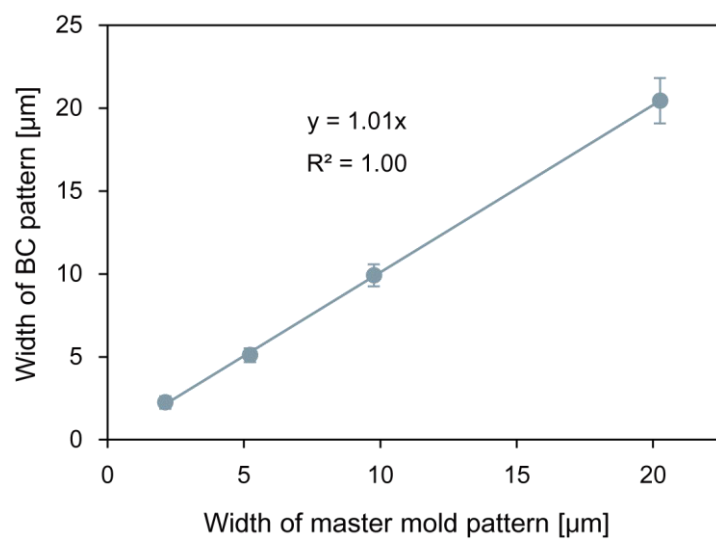


Figure 3.9 Widths of the line patterns on the PDMS master molds and the BC films with convex pattern. Error bars show standard deviation; sample size  $n = 30$ .

### 3.3.4 膜厚の評価

BC膜の膜厚は、応用において重要なパラメータとなりうる。そこで、膜厚と諸条件との関係を調べた。

まず、培養時間と膜厚の関係を調べるため、膜厚0.30 mmのPDMS膜を用いて培養を行った。Figure 3.10にその結果を示す。このグラフが示すように、培養時間が2日から7日に増加するにしたがい、膜厚が84.3  $\mu\text{m}$ から987  $\mu\text{m}$ まで増加した。1日より少ない培養時間では、機械的強度も不十分であったため膜厚の測定は行えなかった。また、BC生成量は菌体濃度に比例する、増殖連動型 (growth associated) の生成物生成過程であることが知られており [73]、2日から4日の培養期間は対数増殖期を反映していると考えられる。したがって、挿入図のように膜厚の対数を縦軸にとることで、培養時間を変化させることにより膜厚を正確に制御可能であることが分かる。

次に、PDMS膜の膜厚がBC膜の膜厚に及ぼす影響を調べた。実験では、0.30, 0.78, 1.02, 3.63, 8.25 mmの膜厚をもったPDMS膜を使用した。なお、0.30, 0.78, 1.02 mmの膜厚をもったPDMS膜は、スピコートにより製作し、3.63, 8.25 mmの膜厚をもったPDMS膜はSU-8基板をプラスチック容器内に配置し、その容器内に注入するPDMSの容量を調節することで製作した。また、培養時間は全ての膜厚で7日とした。Figure 3.11に結果を示す。この結果が示すとおり、PDMS膜の膜厚が増加するにしたがい、BC膜の膜厚は減少していることがわかる。また、膜厚が3.63 mm以上のPDMS膜を使用したサンプルでは、BCの生成が認められなかった。これについて考察を行うため、以下の式で表されるFickの第一法則について考える。

$$F = D \frac{C_{\text{air}} - C_0}{z} \quad (3.5)$$

ここで、 $F$  は細菌の酸素消費速度、 $D$  は酸素の培地における拡散係数、 $z$  は気液界面から深さ方向への距離、 $C_{\text{air}}$  は空気中の酸素濃度、 $C_0$  は位置 $z$  における酸素濃度を表す (Figure 3.12)。これらに各値、 $F = 100 \text{ pmol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ 、 $D = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ 、 $C_{\text{air}} = 160 \text{ nmol mL}^{-1}$ を代入し、BC産生菌がBC生成に要する最低酸素濃度 $C_0 = 100 \text{ nmol mL}^{-1}$ [74]を用いると、 $z = 1.2 \text{ mm}$ となる。この値はFigure 3.11の結果と整合するように見える。一方で、1.02 mm以下の膜厚では、PDMS膜厚とBC膜厚は線形の関係にない。これは、式 (2.21) のように、BC産生菌の増殖速度が酸素濃度と非線形の関係にあるためと考えられる。

これらの結果より、提案のプロセスを用いて生成されるBCの膜厚は、時間とPDMS膜厚に依存することがわかった。PDMS膜厚は、培地中の酸素濃度を介してBC膜厚を変化させるものと考えられる。これらの因子は、BC産生菌を静地培養した際のBC膜厚に影響を及ぼすものと同様であることから、培地成分とその濃度やpH、温度といったその他の因子もBC膜厚に影響をもつと考えられる。

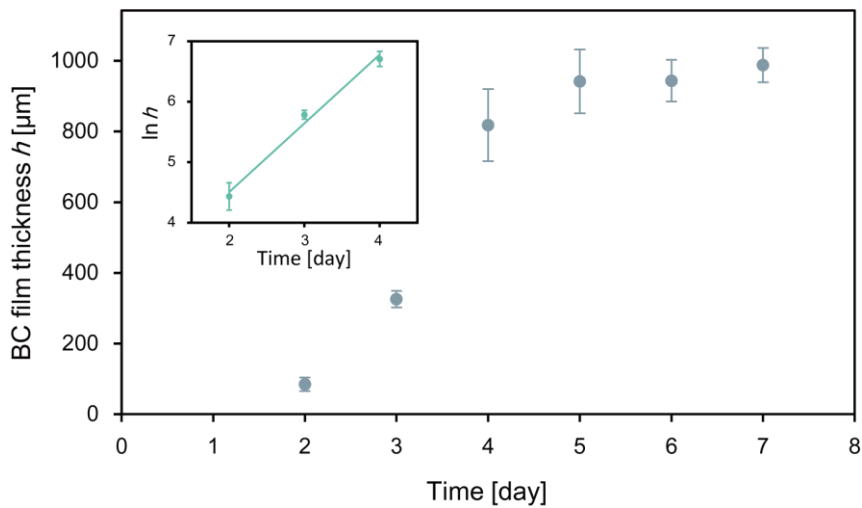


Figure 3.10 Thickness of the micropatterned BC film  $h$  as a function of time. Inset shows the linear fitting from 2 to 4 days. Error bars represent standard deviation; sample size  $n = 9$ .

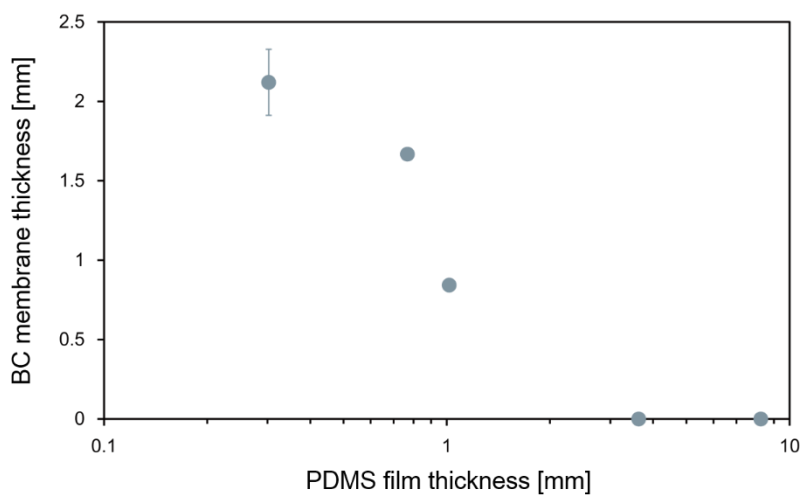


Figure 3.11 Thickness of BC as a function of thickness of PDMS master mold. Error bars show standard deviation; sample size  $n = 9$ .

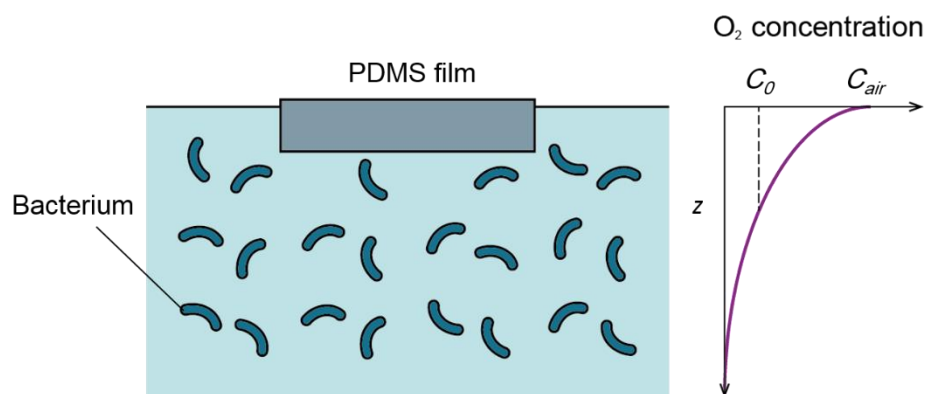


Figure 3.12 Schematic illustration of the cultivation model for micropatterning BC membrane.

### 3.4 結言

本章では、PDMS 鋳型を用いることで BC 膜上に微細構造を転写する方法を提案した。提案の成形プロセスにおいて、鋳型の構造を様々に変えることにより、鋳型構造が正確に転写された BC 膜を作製可能であることを確認した。また、5, 10, 20  $\mu\text{m}$  の幅をもつラインパターンの PDMS 膜を用いて、作製可能な最小サイズを調べた。その結果、パターンの凹凸に関わらず、5, 10, 20  $\mu\text{m}$  全ての構造サイズが製作可能であった。したがって、本プロセスによって成形可能な最小構造は数  $\mu\text{m}$  より小さいと考えられる。この結果と BC のファイバ径が 50 nm 程度であることを考え合わせると、この最小構造は数百-数千 nm オーダであると推定される。BC ナノファイバのナノメートルオーダの構造と、足場のマイクロメートルオーダの構造を複合的に組み合わせることにより、生体内環境をより正確に模倣できる可能性がある。これにより、幹細胞の効率的な分化などが期待される。

また、PDMS 膜の膜厚と BC 膜の膜厚との関係性を評価した。その結果、PDMS 膜厚の増加にともない BC 膜厚が減少することがわかった。また、PDMS 膜厚が一定の値を越えると、BC 膜が生成されないことが明らかになった。これは、BC 産生菌に供給される酸素濃度が、PDMS 膜厚の増加にともなって減少し、ある厚み以上になると BC 生成に必要な酸素供給量が満たせなくなるためであると推測された。

さらに、BC 産生菌の培養時間を変化させることにより、生成される BC の膜厚が約 0.1-1.7 mm の範囲で変化することを確認した。BC 膜厚は細菌濃度に比例することが知られているため、対数増殖期の範囲では、比増殖速度  $\mu_r$  を知ることができれば BC 膜厚を正確に制御することができる。ただし、 $\mu_r$  は温度、酸素濃度、基質濃度などにより変化するため、培養条件に応じて実験的に  $\mu_r$  を求める必要がある。



## 第4章

# BC 微小球の成形技術

### 4.1 緒言

ナノファイバ材料からなる微小球は、ナノテクノロジーの発展とともに近年盛んに研究されている。なお、ここで微小球とはマイクロメートルオーダーの径をもつ粒子のことを指す。特にその有用性が期待されるのは、マイクロキャリアーや細胞送達技術への応用である。

マイクロキャリアーとは、足場依存性をもつ細胞の接触面積を増大させる技術で、抗体医薬など付加価値の高いバイオ医薬品の生産に欠かすことのできないものとなっている[75-81]。一般的には、ポリスチレンやジエチルアミノエチルセルロースなどの安価な材料が用いられるが、マイクロキャリアー単位体積あたりの接触面積を増やし、培養装置内の培地流れの影響を少なくする目的で、多孔質マイクロキャリアーも製品化されている。

細胞送達技術は、組織の再生を目標とし、細胞を付着させた微小球を損傷箇所へ注入する技術である。損傷部形状は不規則かつ複雑であり、注入可能な微小球は実用性が高い[82]。これまで、ナノファイバ材料から微小球を作製し、骨[83]、軟骨[84]、象牙[85]、歯髄[86,87]、椎間板[88]など、様々な部位の再生を目的として研究がなされてきた。

ナノファイバ材料微小球を作製する従来方法としては、乳化重合法[89]や星型構造を有する分子の重合[90,91]といったものがある。しかし、これらの方法では粒径が不均一であり、また用いられる材料には生体適合性が確立されていないものもある。細胞培養の足場材料として多くの研究例をもち、滅菌処理も可能な BC から微小球を作製することができれば、より広範な応用が期待される。本章では、マイクロ流体法と組み合わせることにより、粒径の均一な微小球を得ることができるプロセスを提案し、プロセスの評価を行う。なお、本研究では細胞の足場材料としての応用を想定し、数十～数百マイクロメートルオーダーの粒径を有する微小球の作製を目的とする。

## 4.2 製作プロセスの概要

製作プロセスの概要は、可逆的に相転移する材料の微小球を犠牲構造として、ハイドロゲル内部に球状の空隙を作製し、この空間の中で *K. xylinus* を培養することで、ゼラチン微小球と同形状の BC 微小球を得るというものである。可逆的な相転移を示す材料は多く存在するが、プロセスを考慮すると細菌が死滅しない温和な条件で相転移を示す材料が必要となる。ゼラチンは理想的な温度範囲で固体と液体状態を転移することから、本研究ではゼラチンを用いた。

ゼラチンは、動物の皮膚や骨、腱といった結合組織を酸またはアルカリ処理することにより、構造タンパク質であるコラーゲンが低分子化されて抽出されるものである。常温では未変性のコラーゲンと同様に 3 重螺旋構造をとるのに対し、加熱による分子間会合の解消により、高温ではランダムコイル鎖として振る舞う。十分高濃度かつ高温の水溶液を冷却すると、ゼラチン分子の一部が立体構造転移を起こして 3 重螺旋構造を回復し、これらの部分が網目の結び目となって、ゲルが形成されると考えられている[92]。ゼラチンのゾルーゲル間の相転移はパーコレーション理論によって説明できるとされ、ゼラチンの濃度および冷却速度に依存して転移温度が変化する。また、分子量も転移温度に影響を及ぼすため、ゼラチンの由来と抽出方法にも注意を要する。

また、犠牲構造を包括するハイドロゲルに求められる性質は、ゼラチンを固体状態で包括し、細菌を死滅させないことである。アルギン酸カルシウムゲルは、直鎖型の高分子多糖類であるアルギン酸が、カルシウムイオンによりイオン架橋することで形成される。このゲルは温和な条件でゲル化し、毒性も少ないため、バイオ医療分野において多く用いられている。アルギン酸は  $\beta$ -1,4 結合の D-マンヌロン酸 (M ブロック) と  $\alpha$ -1,4 結合の L-グルロン酸 (G ブロック) から構成されるブロック共重合体である。アルギン酸分子内では、M ブロックと G ブロックが様々な順番で分散しており、異なる分子鎖の G ブロック間で  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$  などの 2 価金属イオンを抱き込み、エッグボックス構造を形成することでゲル化すると考えられている。また、炭酸水素ナトリウムやクエン酸、エチレンジアミン四酢酸などの存在下では金属イオンが奪われ、ゾルへ転移する。

製作プロセスを Figure 4.1 に示す。まず、ゼラチン (和光純薬工業株式会社) を 2.2.2 で調製した溶液 1 に加えて高圧滅菌処理を行う。これに等量の溶液 2 を加えてゼラチンを含んだ培地を調製する。次に、この培地に対数増殖期の *K. xylinus* の懸濁液を体積比 10:1 (= 培地 : 懸濁液) となるよう加え、この溶液が分散相、コーン油 (和光純薬) が連続相となったエマルションを調製した。なお、このコーン油には、ゼラチン液滴の会合、およびゼラチンゲル微小球の凝集を防止する目的で、界面活性剤 (Span 80, Sigma-Aldrich) を加えた。また、エマルションの調製には、乳化法またはマイクロ流体法を用いた。生成されたエマルションは、下流部の遠沈管で回収したのち、冷蔵庫内 ( $2^{\circ}\text{C}$ ) へ移して約 30 分間冷却した。分散相に含まれるゼラチンにより、液滴がゲル化する。その後、純水 ( $2^{\circ}\text{C}$ ) の上にエマルシヨ

ンを加え、回転数 2000 rpm で 1 分間遠心分離することにより、エマルション中の分散相を純水中に移す。分離されたコーン油および純水を取り除いたのち、濃度 1.5 w/w% のアルギン酸ナトリウム水溶液を加え、*K. xylinus* を含んだゼラチン微小球をアルギン酸ナトリウム溶液内に分散させた。なお、用いたアルギン酸ナトリウムは和光純薬株式会社から購入した(粘度範囲：80-120 cp (10 g/L, 20°C))。この分散溶液をプラスチックシリンジ (汎用注射筒 SS-10SZP, テルモ) で吸引し、分注用ノズル (内径：1.2 mm) を用いて塩化カルシウム溶液 (150 mM, 和光純薬) 中に吐出することで、ゼラチン微小球を含んだアルギン酸カルシウムファイバが得られる。これを 2.2.2 で調製した *K. xylinus* の培地内へ移し、恒温槽内 (温度 30°C, 湿度 100% RH) で培養することで、*K. xylinus* が BC 微小球を生成する。ファイバ内の BC を回収するには、ファイバをエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などのキレート剤に浸漬することで、アルギン酸カルシウムゲルファイバは溶解する。本研究では、0.5M の EDTA 溶液 (ニッポンジーン株式会社, pH 8.0) を用いて、BC 微小球を回収した。

なお、ゼラチンを含有する菌懸濁液は、ゼラチン水溶液を菌懸濁液に加えることで調製した。混合前の菌懸濁液は、液体培養した静止期の *K. xylinus* をフィルターで BC を除くことで得られる。プロセスの性質上、菌濃度が高いほど最終的な BC 微小球の収率は高いと考えられる。つまり、加えるゼラチン溶液は少なければ少ないほど望ましい。そこで、まずゼラチン (和光純薬) 試薬が水に溶解する最大量を求めた。その結果、35 w/w% が最大濃度であることがわかった。次に、菌懸濁液がゲル化するゼラチン溶液の最小追加量を求めるため、試験管倒立法[93]によりゼラチンのゲル化点を調べた。その結果、ゼラチンの最終濃度が 4 w/w% 以上のときゼラチン溶液はゲル化し、それを下回るときゼラチン溶液はゲル化しないことがわかった。そこで、ゼラチンの最終濃度が 4 w/w% となるよう、ゼラチン含有菌懸濁液を調製しこれを用いた。

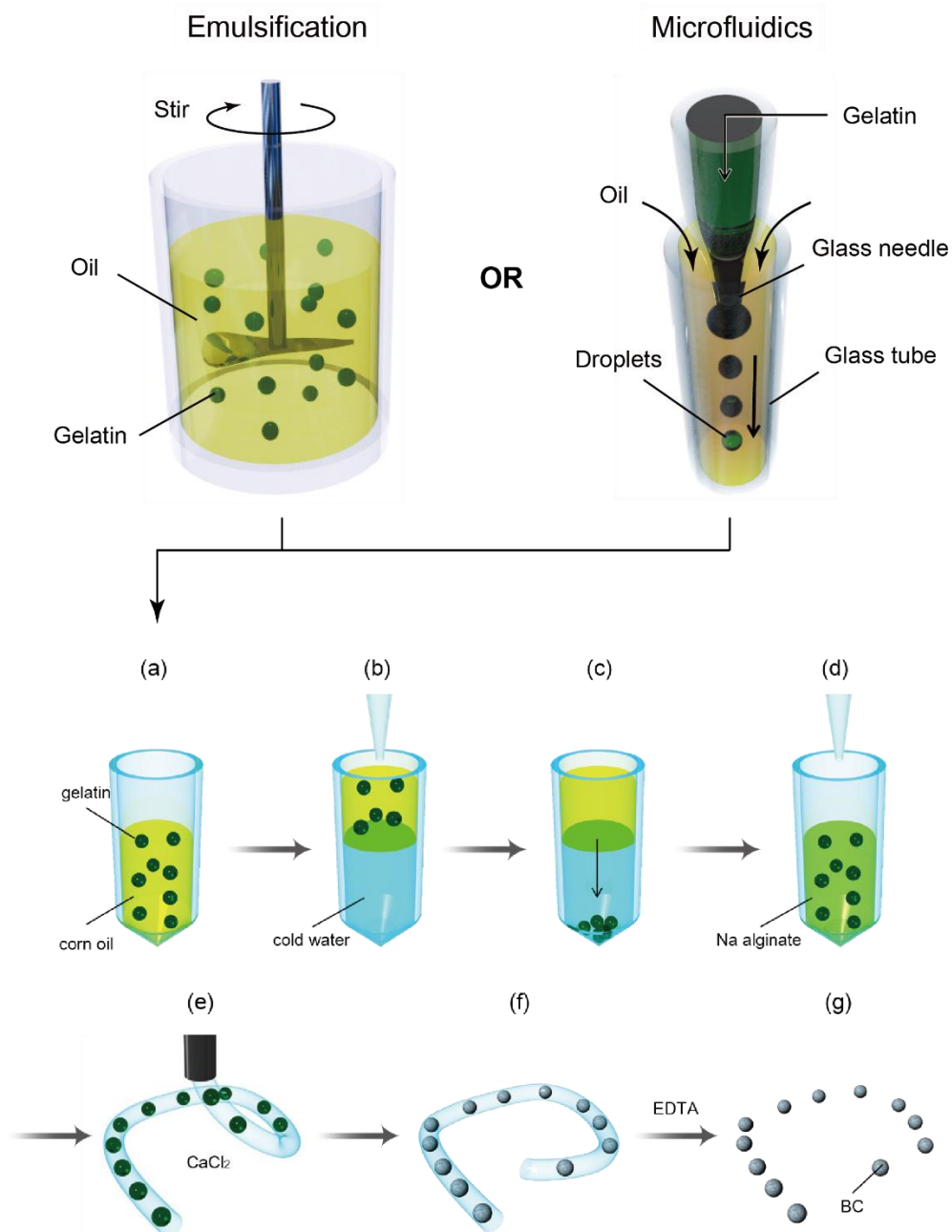


Figure 4.1 Process flow of the fabrication method: Emulsion is prepared using emulsification or microfluidics. **(a)** The emulsion is cooled to turn the gelatin droplet to gel state. **(b)** The emulsion is placed onto cold water ( $\sim 2^{\circ}\text{C}$ ). **(c)** The gelatin microspheres are transferred into the cold water by centrifuge. **(d)** The gelatin microspheres are dispersed in Na-alginate solution. **(e)** Ca-alginate fiber is formed in  $\text{CaCl}_2$  solution. **(f)** In culture medium at  $30^{\circ}\text{C}$ , the gelatin changes to sol state. Here, the bacteria produce BC in the calcium alginate gel fiber. After production of BC, the calcium alginate gel fiber is dissolved in solution of EDTA. **(g)** The BC microspheres are obtained.

## 4.3 乳化法によるゼラチン微小球の調製

### 4.3.1 エマルション安定性[94]

エマルションは粒径に従って、以下のように3つに分類できる。

- マイクロエマルション：100 nm 以下
- ミニエマルション：100 nm -1  $\mu\text{m}$
- マクロエマルション：1  $\mu\text{m}$  以上

マイクロエマルションはそのサイズの小ささから、分散相、連続相および界面活性剤を適切に選定することで、熱力学的に安定した系とすることができるが、ミニエマルションおよびマクロなエマルションは準安定状態であり、最終的には必ず2相に分離する。このエマルションの熱力学的な安定性は以下の式で与えられる。

$$\Delta G_{\text{form}} = \Delta A\gamma_{12} - T\Delta S_{\text{conf}} \quad (4.1)$$

ここで、 $\Delta G_{\text{form}}$  はエマルション形成に伴うギブズ自由エネルギー変化、 $\gamma_{12}$  は2相の界面張力、 $\Delta S_{\text{conf}}$  は配置エントロピー変化、 $\Delta A$  は界面の面積変化であり、この式から  $\Delta G_{\text{form}}$  が負であればエマルションは自発的に形成されることがわかる。ミニエマルションとマクロエマルションの場合、この値は正となりエマルションの形成には粉碎などのエネルギー入力を要する。

この粉碎は、主に強制的な流れを繰り返し与えることで行われ、乳化法と呼ばれる。流れは一般的に乱流となり、大きな液滴が引き伸ばされて、テイラー不安定によって小さな液滴へ崩壊する。この過程では液滴の再合一も同時に起こっているため、液滴径を正確に制御することは困難である。平均の液滴サイズは単位時間当たりの供給エネルギーに依存し、これが大きいほど、平均液滴サイズは小さくなる。また、界面活性剤などの乳化剤を加えることで  $\gamma_{12}$  が低下するので、乳化剤は平均液滴直径を大きく減少させる。界面活性剤はさらに、液滴の再合一を抑制することでエマルションの安定性を向上させる。本研究で作製するエマルションは、分散相がゼラチン水溶液の油中水滴 (W/O) エマルションであり、乳化剤を適切に選定することでエマルションの安定性を大きく向上させることができる。どの乳化剤を選定するかは依然として経験によるところが大きいですが、Griffin [95]によって導入された以下の式で表される親水-親油バランス (HLB) が一般的に利用される。

$$\Delta G_{\text{form}} = \Delta A\gamma_{12} - T\Delta S_{\text{conf}} \quad (4.2)$$

HLB<10 のとき W/O エマルションが形成され、HLB>10 の場合は O/W エマルションが形成

されることとなる。マクロな W/O エマルションを作製する場合、HLB が 3-6 程度の界面活性剤が一般的に用いられる。

エマルションの崩壊過程は、以下に示す 4 つの機構に大きく分類される。

### (1) 沈降と浮上 (クリーミング)

希薄なエマルションの場合、沈降または浮上する速度  $v_s$  は次式で表される。

$$v_s = \frac{2\pi\Delta\rho g a^2}{9\eta} \quad (4.3)$$

ここで、 $\Delta\rho$  は分散相と連続相の密度差、 $g$  は重力加速度、 $a$  は液滴半径、 $\eta$  は連続相の粘度である。この式から、分散相と連続相の密度差が小さくなるよう、油を選定すればよいことがわかる。また、 $\eta$  を増加させることで沈降速度が減少し、エマルションの安定性を増加させることができる。この目的で、連続相に高分子を添加させるといった方法も用いられる。

### (2) 凝集

液滴同士が会合し、より大きな集合体となる現象は凝集とよばれる。液滴間には静電斥力とファンデルワールス引力が働き、これらの全相互作用によってコロイド粒子の安定性が評価できる。この理論は提唱者の頭文字をとって、DLVO 理論とよばれる。ファンデルワールス引力は連続相環境の変化に対して敏感ではないため、一定とみなすことができる[96]。静電斥力は距離の 2 乗に反比例する一方、一般的にファンデルワールス力は距離の 6 乗に反比例するため、斥力によるエネルギー障壁を熱エネルギー  $k_B T$  が上回り、液滴同士が十分に接近すると、引力が斥力を常に上回り凝集が引き起こされる。連続相が水やエチレングリコールのような極性の大きい液体であるとき、pH 変化やイオン性界面活性剤の添加により、静電斥力を増加させることでエマルションを安定させることができる。一方、W/O エマルションでは連続相の極性が小さいため、凝集を防ぐには界面活性剤を系に導入し、構造的に凝集を阻害して安定化させることが必要である。

### (3) 合一

2 つの液滴が互いに近接すると、慣性エネルギーによって液滴間の連続相は平らな薄膜を形成する。この薄膜が何らかの要因で破裂することで、液滴は合一する。この破裂は、熱的あるいは機械的な振動波の節同士が接近し、膜中に穴を形成することで引き起こされる。界面活性剤が液滴表面に吸着したエマルションでは、振動波が 2 つの界面の面積増加  $\Delta A$  により妨げられる。界面の拡張のしやすさは界面の膨張率、すなわちギブズの弾性率  $\epsilon$  と呼ばれる以下の式で定義される。

$$\varepsilon = \frac{d\gamma_{12}}{d\ln A} \quad (4.4)$$

$\varepsilon$  が大きいほど、エマルションは合一しにくくなるが、界面活性剤濃度  $c_s$  が大きいほどこの効果は大きい。これは、界面内の界面活性剤移動により、波の節で界面活性剤の濃度が減少するが、バルク相内の界面活性剤がこの枯渇領域に流れ込むため、枯渇が相殺されるためである。しかし、十分高い  $c_s$  では、振動波によって生じる界面活性剤分子の界面に沿う移動速度が、界面活性剤のバルク相から液滴表面への吸着速度と等しくなるため、式 (4.4) の  $d\gamma_{12}$ ,  $\varepsilon$  両方が減少する。したがって、エマルションの合一を抑制するための  $c_s$  に最適値があることが示唆される。

#### (4) オストワルド成長

湾曲した液液界面の両側には圧力差  $\Delta p$  が存在し、以下のラプラス式で与えられる。

$$\Delta p = \frac{2\gamma_{12}}{r} \quad (4.5)$$

ここで、 $r$  は液滴の半径である。この圧力差はラプラス圧と呼ばれ、液滴が小さいほど大きくなる。よって、小さい液滴は大きな液滴へ連続相を横切って液滴のサイズが等しくなるまで分子が移動し、エマルションを不安定化させる。この現象はオストワルド成長と呼ばれる。この現象は、液滴のサイズ分布が広い、つまり多分散性が高いほど促進される。また、式 (4.5) から分かるように、界面活性剤の添加により界面エネルギー  $\gamma_{12}$  が小さくなることで、オストワルド成長を抑えることができる。しかし、分散相分子の連続相への溶解度が増すほど、移動速度が増加するため、過剰な界面活性剤はオストワルド成長を促し、エマルションを不安定化する。このことから、エマルションの安定性に関して、界面活性剤濃度  $c_s$  には最適値が存在することが示唆される。

### 4.3.2 油／界面活性剤系の決定

本プロセスに使用する油と界面活性剤の選定において、BC 産生菌を死滅させないことが求められる。また製作プロセスを考慮すると、ゼラチンをゲル化させるためにエマルションを冷却する必要がある。ゼラチンのゲル化転移点が 20℃程度であるため、凝固点がこの温度以下である油を使用しなければならない。したがって、油はコーン油を選定した。また、界面活性剤の候補としては W/O エマルションに適した HLB を有する Span 80 (メルク株式会社, HLB : 4.3) を選定した。界面活性剤の最適な濃度を決定するため、様々な濃度の界面活性剤を用い、攪拌によりエマルションを調製しエマルションの安定性を評価した。

エマルション安定性の評価指標として、Pearce と Kinsella が 1978 年に提案した以下の値が用いられることがある[97]。

$$ESI = \frac{\tau(0)t}{\tau(t) - \tau(0)} \quad (4.6)$$

ここで、 $\tau(0)$  と  $\tau(t)$  はそれぞれ初期と一定時間後の濁度であり、特定の波長を用いた分光光度計によって簡便に測定できる。しかし、濁度と粒径の間に単純な相関はないため、エマルションの評価指標として上式を用いるのは不適切である。

そこで、正確にエマルション安定性を評価する指標として、近年では Emulsion Stability Index (ESI) と呼ばれる以下の式が用いられる。

$$ESI = \frac{d(0)t}{d(t) - d(0)} \quad (4.7)$$

ここで、 $d(0)$  は液滴の初期平均直径であり  $d(t)$  は  $t$  時間後の平均直径を表す。この ESI を用いる上での注意点は、(1) 粒径は線形に増加しないので、経過時間はそろえる。(2) 液滴成長は初期の粒径分布に依存するので、初期の平均直径を極力そろえる必要がある。

ゼラチン球の直径は、レーザ回折／散乱法に基づく粒子分布計測装置である LA-960 (株式会社 堀場製作所) を用いた。本装置は赤色 (波長 650 nm) 半導体レーザおよび青色 (波長 405 nm) 発光ダイオードを用いた光学系により、20 nm から 5 mm までの粒子直径が測定可能とされる。粒子径直径の測定方法としては、他に光学顕微鏡による画像処理が挙げられるが、安定性の乏しいエマルションののでは、測定中に液滴径が変化し、正確な液滴径の評価が困難である。レーザ回折／散乱法では、Mie 散乱理論に基づき粒子径分布を短時間で測定が可能であるため、本実験に最適な手法である。

界面活性剤の最適な濃度を決定するため、以下の手順でエマルションを調製し、液滴径分布を測定した。

- (1) マグネットスターラーを内包した遠沈管に菌懸濁液とゼラチンの混合溶液を 1



mL 滴下し、次いで Span 80 を混合したコーン油を 9 mL 滴下した。

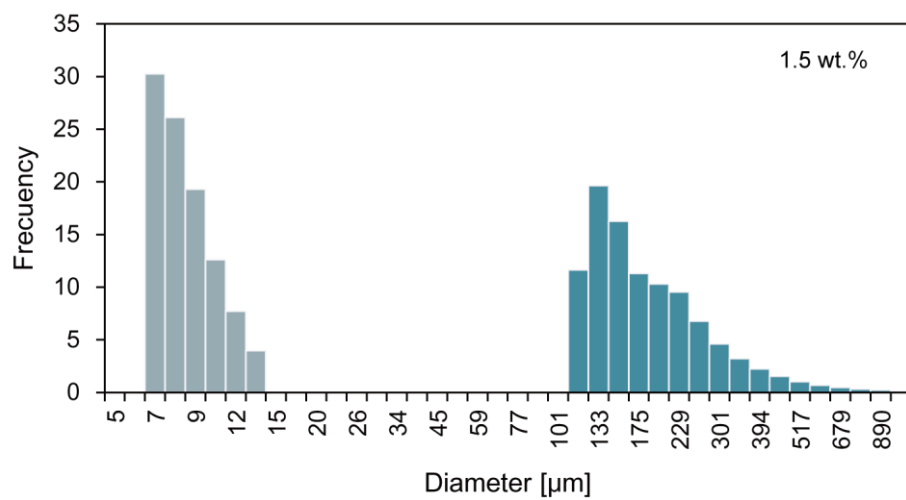
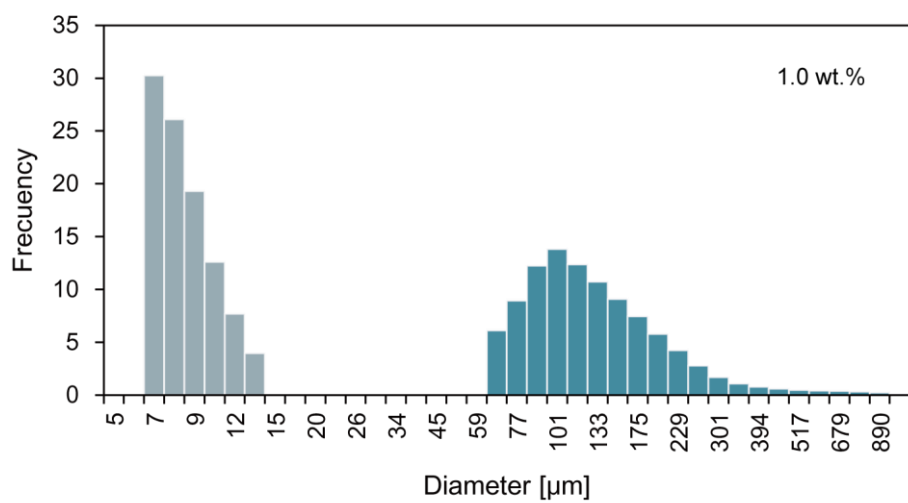
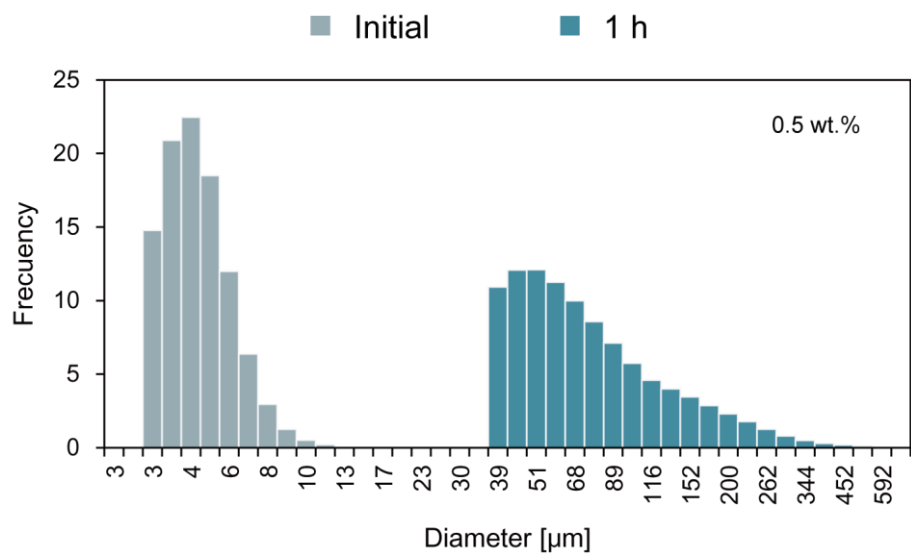
(2) スターラーを用いて、回転数 750 rpm で 3 分間上記の液体を攪拌し、エマルジョンを調製した。

(3) 調製したエマルジョンを 10 mL のコーン油に 50  $\mu$ L 滴下し、十分攪拌して測定サンプルを調製した。

(4) コーン油の屈折率を 1.47 で設定し、粒子径分布測定を行った。

(5) エマルジョンの調製から 1 時間後、再び同様の希釈率で測定サンプルを調製し、粒子径分布計測を行った。

Figure 4.2 に代表的な粒子径分布を示す。Span 80 の濃度が低いとき、エマルジョンの調製から 1 時間経過すると崩壊過程によって液滴径が大きくなっていることがわかる。また、濃度が増加するにつれて分布がエマルジョン調製直後と 1 時間経過後に差がなくなっていくことがわかる。この安定性を定量的に評価するため、それぞれのサンプルの平均径を用いて ESI を式 (4.7) から算出した。結果を Figure 4.3 に示す。Span 80 の濃度が 2.5% を超えると急激に安定性が増していることがわかる。これは、界面活性剤が全てのコロイド表面を被覆する濃度がこの付近であるためと考えられる。また、界面活性剤濃度 8% で安定性は極大値をとるようにみえるが、これは式 (4.7) をみると分かるように、分母が小さいほど、つまり初期液滴径と 1 時間経過後の液滴径の差が小さくなるほど、安定性が過大に評価される。実際、界面活性剤濃度が 3% より大きいとき、初期径と終端径の間に統計的有意差がなくなる。よって、以降では Span 80 の濃度を 3% とした。



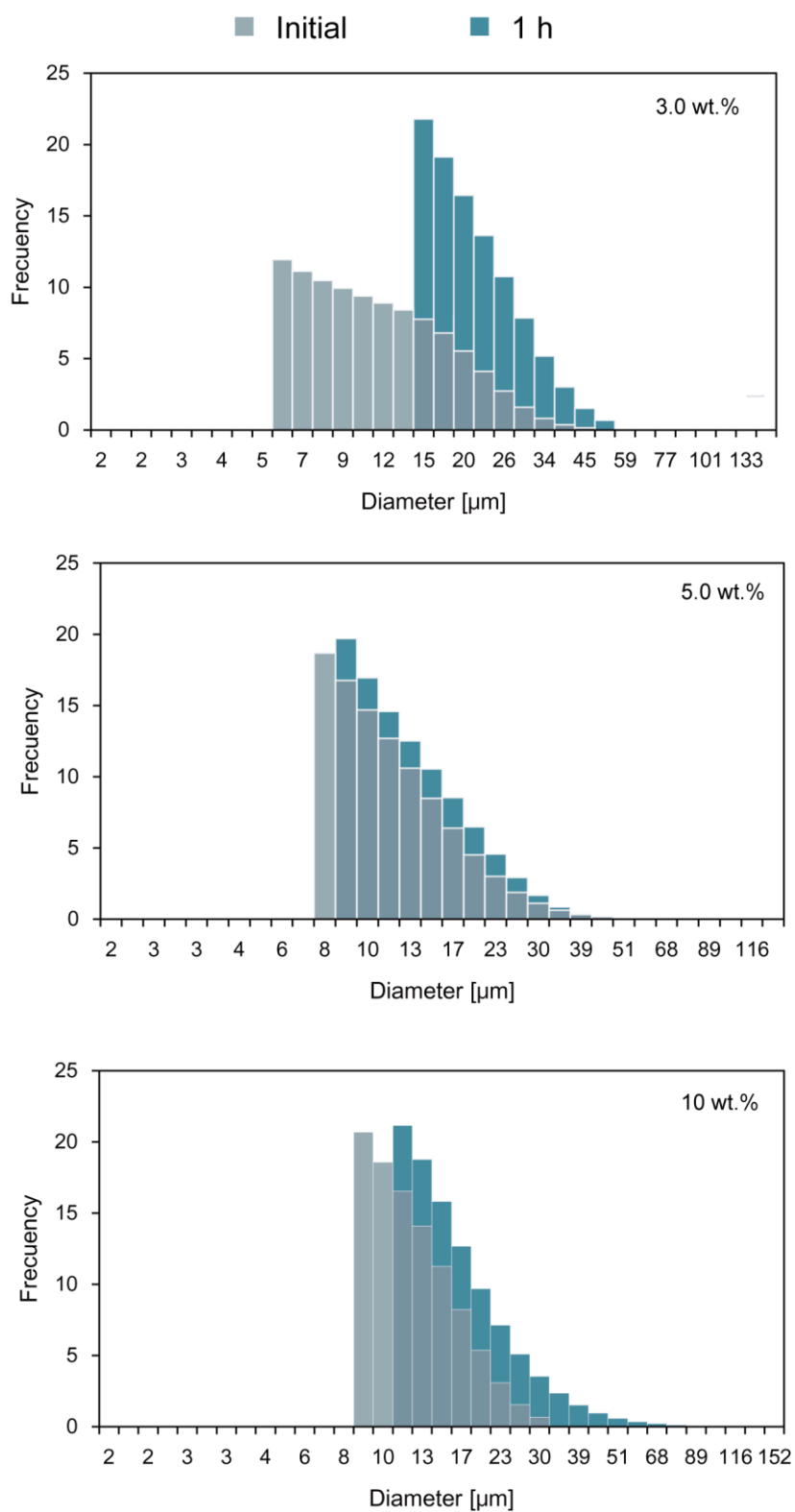


Figure 4.2 Size distributions of the droplets with different concentrations of Span 80. Frequency is based on the number of particles measured by laser diffraction scattering type particle size distribution measuring method.

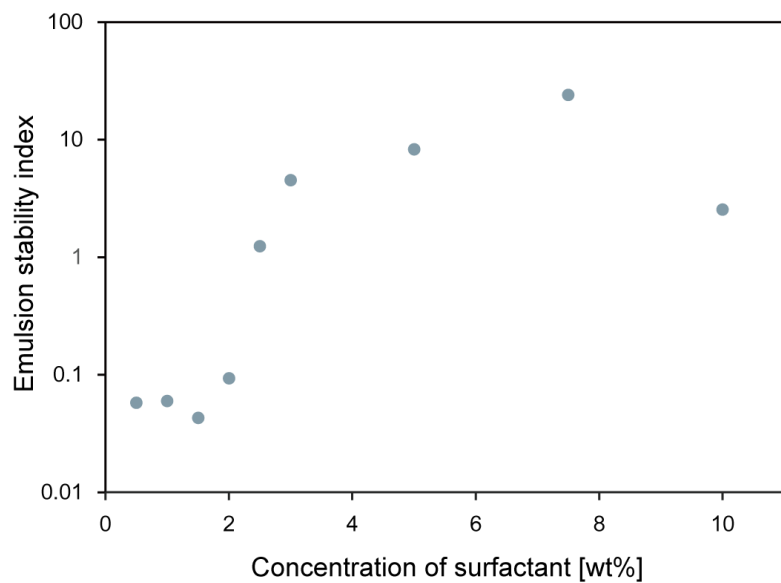


Figure 4.3 Emulsion stability index (ESI) versus the concentration of span 80. ESI was calculated from Eq. (4.7).

## 4.4 マイクロ流体デバイスによるゼラチン微小球の調製

### 4.4.1 液滴生成デバイス[98]

マイクロメートルオーダーの構造体から構成されるマイクロ流体デバイスでは、層流の性質を利用して流れの正確な制御が可能となる。これにより、一定のせん断応力を発生させることができるため、極めて単分散性な、すなわち液体サイズの均一性が高い液滴生成が可能となる。液滴生成デバイスは、その応用性の高さからこれまで様々な研究が行われてきた。液滴生成の原理は大きく分けて受動型と能動型に分けられる。

受動型では、交じり合わない 2 相の流れがシリンジポンプなどの一定のエネルギー入力によって制御される。その機構の簡便さから粒径の予測式を始め、能動型と比較して理論が充実している。

一方、能動型では受動型で用いられる微小構造に加え、クーロン力などの追加的なエネルギー入力を用いて液滴を生成する。受動型と比較し、より広範囲かつ正確に液滴サイズを制御でき、また液滴生成速度を大幅に低減することも可能である。

また、マイクロ流体デバイスはソフトリソグラフィ技術による 2 次元型と、3D プリンタやガラスキャピラリーなどから構成される 3 次元型に分けられる。2 次元型では分散相流体が流路壁に付着することで安定な液滴生成が行えないなど、いわゆる濡れ性の問題 (Wetting problem) が現れる。よって、本研究では煩雑な作業を要さず作製が可能な 3 次元型の同軸流 (Co-flow) 原理のマイクロ流体デバイスを用いた。

#### 4.4.2 理論[99]

同軸流による液滴生成デバイスの液滴生成過程を Figure 4.4 に示す。この液滴生成は、分散相の体積流量  $q_d$  や連続相の体積流量  $q_c$  などに応じて、様々な領域に変化する。マイクロ流体デバイスを用いる最大の利点は、サイズが均一な液滴が得られるという点であり、これはドリッピング (Dripping) 領域において実現される。したがって、本研究ではドリッピング領域のみで液滴を生成することとし、この領域における液滴径の理論式について以下で述べる。

ドリッピング領域においては、連続相の流れによる液滴表面の粘性応力が液滴の界面張力を越えるまで、液滴はサイズを増す (Figure 4.4)。ここで、ガラスニードルが液滴を保持する界面張力は  $\pi d \gamma$  と表せる。レイノルズ数 ( $Re = d v \rho_c / \eta_c$ ) が十分低いとき、連続相による抗力はストークスの法則より  $3\pi \eta_c (d - d_0)(v - v_d)$  で表せる。ここで、 $\rho_c$ 、 $\eta_c$ 、 $v$  はそれぞれ連続相の密度、粘度、速度である。また、 $d$  は液滴径、 $v_d$  は成長する液滴の流線速度成分である。 $d - d_0$  の項はガラスニードル先端による液滴の遮蔽効果を表す。また、 $v - v_d$  は連続相と液滴周囲流速の相対速度であり、 $v_d \approx q / \pi d^2$  である。浮力、ラプラス圧はそれぞれ、 $\pi d^3 g \Delta \rho / 6$  ( $\Delta \rho$  は 2 相の密度差)、 $\pi \gamma d_i^2 / d$  ( $d > d_i$ ) と表せるが、本研究で用いたシステムではこれらの値は小さく無視できる。また、分散相がガラスニードルから液滴へ流入する際、運動量に変化することによる力は  $4\rho d q^2 / d^2$  と表せる。この力も小さいため無視できる。

よって、界面張力と抗力の釣り合いから、

$$\tilde{v} \tilde{d}^3 - (\tilde{v} + 1) \tilde{d}^2 - \tilde{q} \tilde{d} + \tilde{q} = 0 \quad (4.8)$$

となる。ここで、 $\tilde{v} = v/v_0$ 、 $\tilde{d} = d/d_i$ 、 $\tilde{q} = q/q_0$ 、 $v_0 = \gamma/3\eta_c$ 、 $q_0 = \pi d_i^2 \gamma / 3\eta_c$  である。また、 $d_i \approx d_0$  と仮定している。

$q_0$  に比べて  $q$  が小さいとき、 $\tilde{q}$  の項は無視でき、

$$\tilde{d} = 1 + \tilde{v}^{-1} \quad (4.9)$$

となる。実際には、補正係数  $a, b$  を用いて

$$\tilde{d} = a + b \tilde{v}^{-1} \quad (4.10)$$

とすることで、より実験値との整合性が向上する。ここで、 $a, b$  はガラスニードル径に依存した係数であり、1 に近い正数となる。

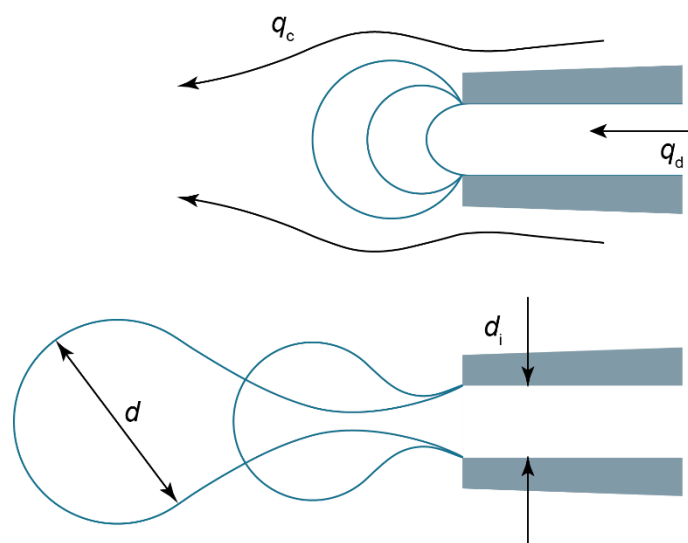


Figure 4.4 Schematics of the drop evolution in the co-flow microfluidic device.

### 4.4.3 デバイスの製作

本研究におけるマイクロ流体システムの概要図を Figure 4.5 に示す。図に示したマイクロ流体デバイスの製作にあたり、まずガラス管 (内径 : 0.4 mm, 外径 : 1.2 mm, リングスキャップス, アズワン株式会社) をガラスプーラー (PC-10, 株式会社成茂科学器械研究所) によって延伸し, 中空のガラスニードルを製作した。プーラーに固定されたガラス管は, ヒータにより加熱されながら重りによって引き伸ばされ, 鋭利な先端をもつガラスニードルとなる。この先端を切断する位置をマイクロフォージ (MF-900, 株式会社成茂科学器械研究所) により調製することで, 様々な内径をもつ中空ガラスニードルが製作できる。次に, あらかじめ固化させた PDMS (厚さ 2 mm 以下) の層の上に分注用ノズル (外径 : 1.3 mm) を配置し, PDMS プレポリマ (主剤:重合剤=10:1 (体積比)) に埋没させて固化させたのち, 分注用ノズルを引き抜くことで, 径 1.3 mm の円形断面流路を製作した。この流路の入口側に, ガラスニードルと T 字型プラスチックコネクタ (ミニフィッティング VFT106) を挿入し, 出口側にプラスチックコネクタ (ミニフィッティング VFI116) とシリコンチューブ (内径 : 1.5 mm, 外径 : 2.5 mm) を接続し, それをステンレス製の中空金属管 (内径 : 1 mm, 外径 : 2 mm, 長さ 0.5 m) に接続した。この金属管を冷却浴に浸すことで, 生成された液滴を合一させることなく, 流路内でゲル化させた。

また, T 字型プラスチックコネクタの連続相側入り口にはシリコンチューブ (内径 1.5 mm, 外径 2.5 mm) を介してフローレスポンプ (スムーズフローポンプ Q, 株式会社タクミナ) からコーン油が流入するようにデバイスを構成し, また分散相側の入り口はシリコンチューブ (内径 1.0 mm, 外径 2.0 mm) を介してシリンジポンプと接続し, ゼラチンと *K. xylinus* 懸濁液の混合溶液が流入するようデバイスを組み立てた。なお, ここで使用したプラスチックコネクタおよびシリコンチューブは全てアズワン株式会社から購入した。



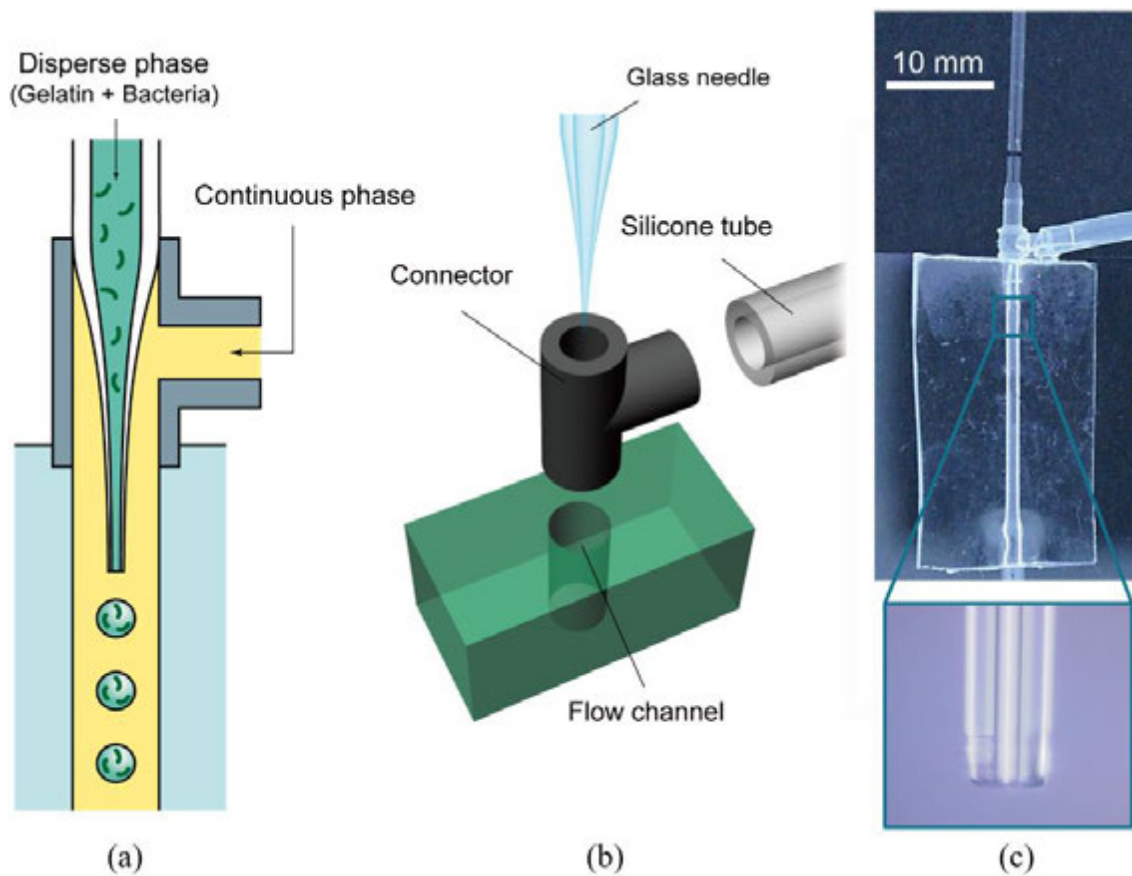


Figure 4.5 Microfluidic device for generating monodisperse gelatin microspheres. (a) The schematic illustration of the microfluidic device. Droplets of the continuous phase were formed at the tip of the glass needle. Prepared emulsion was collected at the end of the glass capillary in cold water. (b) The schematic of the microfluidic device composed of a plastic T junction connector, a hollow glass needle, and polydimethylsiloxane (PDMS) flow channel. (c) The photographs of the hollow glass needle and the flow channel. The needle was coaxially set in the channel.

#### 4.4.4 実験

4.4.2 で示したように、同軸流には様々な液滴生成モードが存在する。単分散な液滴を得るには、ドリッピング領域内で液滴を生成することが望ましい。したがって、まず分散相と連続相の流速を変化させ、液滴生成のモードについて調べた。なお、本実験ではガラスニードル内径が  $50\ \mu\text{m}$  のものを使用した。流速を変化させることで、ドリッピング領域やジェットング領域が現れる。これを様々な流速で観察し、発現したモードを分類した結果を Figure 4.6 に示す。ここで、分散相の流速は  $We$  数として、連続相の流速は  $Ca$  数として表した。なお、 $We$ 、 $Ca$  数の算出にはゼラチン溶液の密度が  $1200\ \text{kg/m}^3$ 、粘度  $1.0\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ 、コーン油が密度  $916\ \text{kg/m}^3$ 、粘度  $75\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ 、また 2 相間の界面張力は  $0.02\ \text{Nm}^{-1}$  という値を使用した。

次に、ドリッピング領域において液滴を生成し (Figure 4.7) , その粒径を計測した。結果を Figure 4.8 に示す。粒径の均一さを表す CV 値は、全ての条件において 4%未満であった。工業的には 10%未満が単分散性の基準とされていることから、本プロセスにおいてもマイクロ流体法によって単分散なエマルションが得られることがわかった。また、グラフの実線は式 (4.10) を用いてフィッティングを行った結果である。なお、フィッティングにはオープンソースソフトウェアの `gnuplot` を用い、最小自乗法により求めた。全ての流速およびガラスニードル径において、実験結果は理論式とおおよそ適合した。

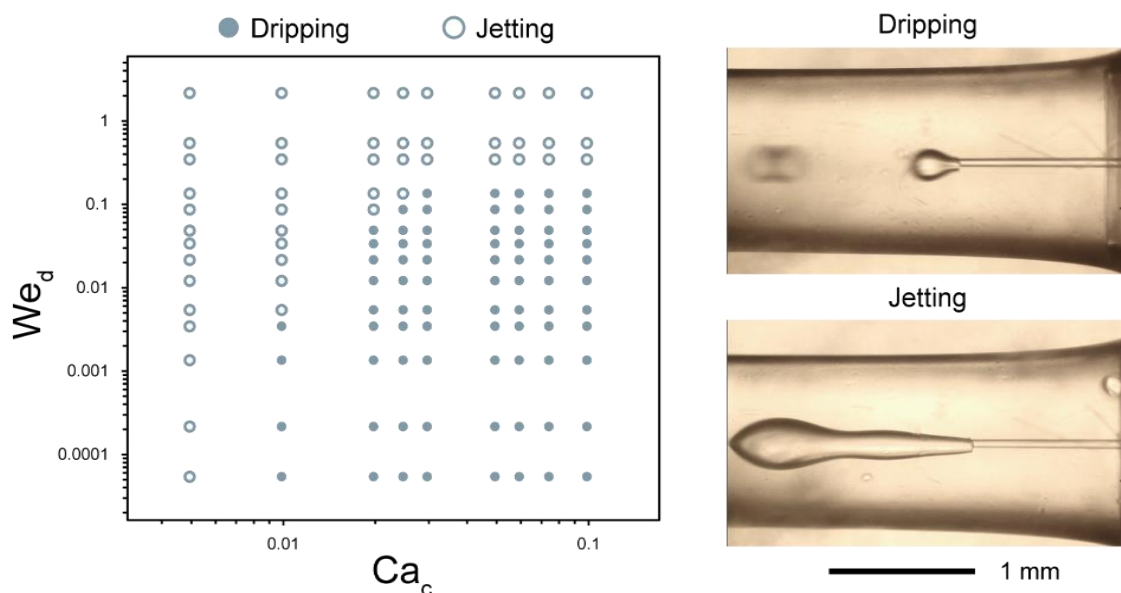


Figure 4.6 Phase diagram in  $Ca_c$ ,  $We_d$  plane for dripping and jetting regime in the co-flow microfluidic device. For calculation of  $Ca_c$  and  $We_d$ , following values were used;  $\rho_d = 1200\ \text{kg/m}^3$ ,  $\eta_d = 1.0\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ ,  $\rho_c = 916\ \text{kg/m}^3$ ,  $\eta_c = 75\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ ,  $\gamma = 0.02\ \text{N/m}$ .

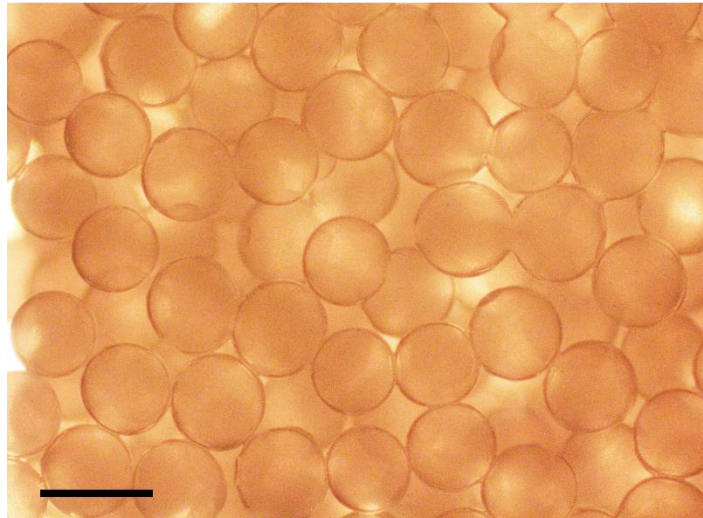


Figure 4.7 Micrograph of the produced gelatin microspheres using the co-flow microfluidic device. Scale bar, 400  $\mu\text{m}$ .

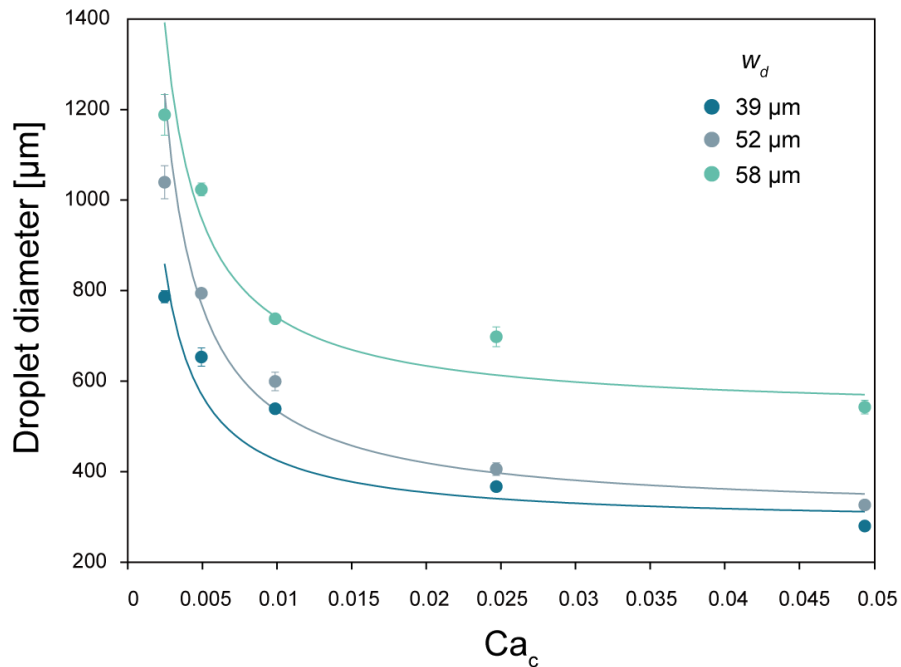


Figure 4.8 Droplet diameter versus capillary number of the outer fluid for gelatin in corn oil emulsion using the co-flow microfluidic device. Solid curve is a fit using Eq. (4.10), where  $w_d = 39 \mu\text{m}$ ,  $a = 7.3$ ,  $b = 0.1$ ;  $w_d = 52 \mu\text{m}$ ,  $a = 5.9$ ,  $b = 0.1$ ;  $w_d = 58 \mu\text{m}$ ,  $a = 9.1$ ,  $b = 0.1$ . Error bars represent the standard deviation; sample size  $n > 19$ .

## 4.5 BC 微小球の成形

乳化法またはマイクロ流体法により調製したエマルジョンを、アルギン酸カルシウムゲルファイバ内に移し (Figure 4.9), *K. xylinus* を 2 日間培養することによって, BC 微小球を作製した (Figure 4.10).

乳化法を用いて調製したエマルジョンの粒径分布と, 調製されたエマルジョンを用いて作製した BC 微小球の粒径分布を Figure 4.11 に示す. なお, エマルジョンは, 回転数 750 rpm で 3 分間攪拌を行うことで調製した. 攪拌後, エマルジョンは 2 時間冷水浴中で冷却した (2°C). エマルジョンの液滴直径は平均が 5  $\mu\text{m}$  で, 最小径は 2  $\mu\text{m}$  である. 一方, BC 微小球の最小径は 10  $\mu\text{m}$  であった. これは, 径 10  $\mu\text{m}$  以下の空間内部では BC のナノファイバが絡み合っただけでゲルを形成することができなかつたためと考えられる. この結果から, 本プロセスにより製作可能な最小径は 10  $\mu\text{m}$  であることがわかった.

次にマイクロ流体デバイスを用いて調製したエマルジョンを使用し, 作製した BC 微小球の粒径を Figure 4.12 に示す. 横軸は, エマルジョン作成時の連続相流速であり, 縦軸はそれに対応した BC 微小球の粒径を表す. BC 微小球の粒径は, エマルジョンの粒径と同様の傾向, すなわち液滴生成において連続相流速の増加, またはガラスニードル径の減少に伴って粒径が減少するという傾向を示した. また, 全ての条件において CV 値は 6%未満であり, マイクロ流体法を用いることで単分散な BC 微小球を成形できることを確認した. しかし, どの流速においても, エマルジョンでの粒径よりも作製された BC 微小球の粒径は小さくなっていた. Figure 4.13 に, 横軸にエマルジョン中のゼラチン微小球の径, 横軸左側に BC 微小球の径をとったグラフを示す. また, 縦軸右側はゼラチン微小球の径に対する BC 微小球の径の割合を示しており, 径に関わらず 80-90%の大きさに BC 球が縮小していることがわかる. 実際, Figure 4.14 (b) のように, 培養後ではゼラチン微小球により形成されたゲルファイバ内の空洞と BC 球の間に隙間がある. これが, ゼラチン微小球よりも BC 微小球の径が小さくなっていた原因であると考えられる. 隙間が形成された要因としては, ゼラチン分子が周囲の壁面に吸着され, 一定の厚みをもった層が形成されたことが考えられる. 実際, アルギン酸カルシウムは, M ブロックのカルボキシ基により負に荷電しており,  $\epsilon$ -ポリ-L-リジンのような水溶液中で正に帯電する高分子を吸着させることで膜を形成することができる[100, 101]. しかし, 本実験で用いたゼラチンはアルカリ処理されたものであり, 中性付近の pH では負に帯電するはずであるため, 壁面への吸着が起こりえない. その他の原因としては, 細菌とアルギン酸カルシウムゲルとの静電的反発力が考えられる. 通常, 細菌は細胞膜上のカルボキシ基などの官能基により負に帯電している[102]. 一方, アルギン酸カルシウムも負に帯電しているため, 細菌とアルギン酸カルシウムゲルの間に静電的反発力が働き, 細菌はゼラチン微小球よりも小さな径の BC を生成したことが考えられる.

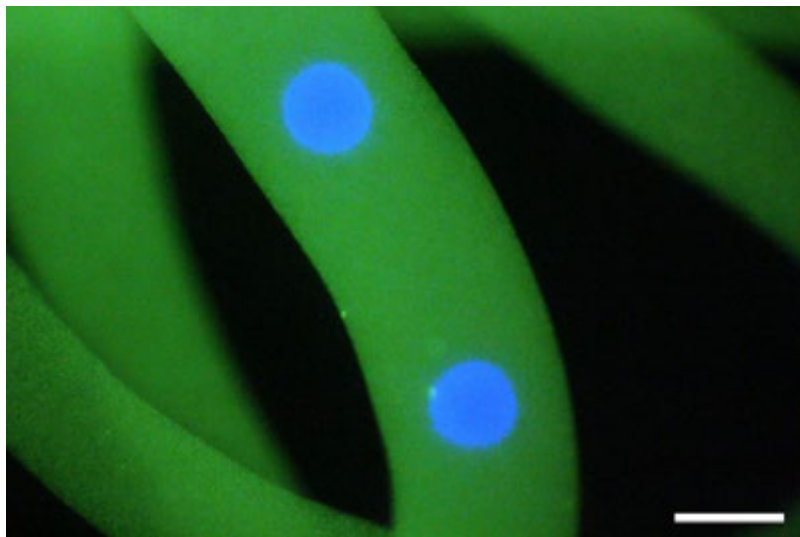


Figure 4.9 Merged fluorescent micrograph of the Ca-alginate hydrogel fiber containing gelatin microspheres colored with blue and green fluorescent particles. Scale bar, 400  $\mu\text{m}$ .

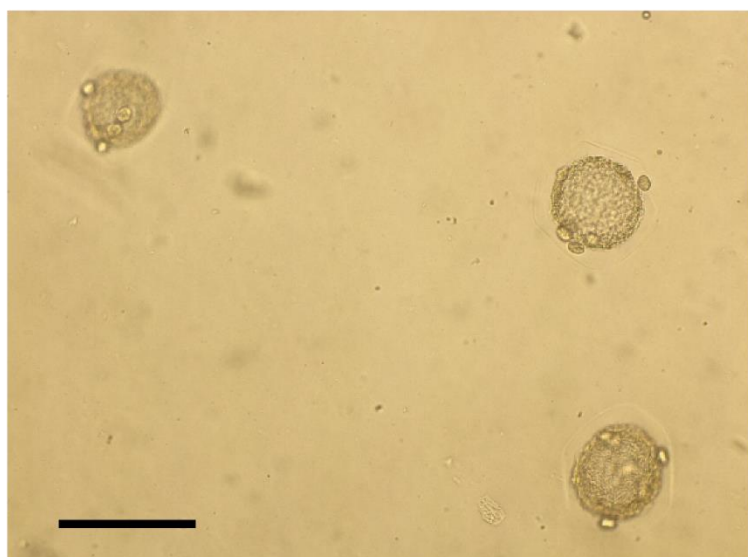


Figure 4.10 Optical micrograph of the produced BC microspheres in Ca-alginate hydrogel fiber after 2-day-cultivation of *K. xylinus*. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .

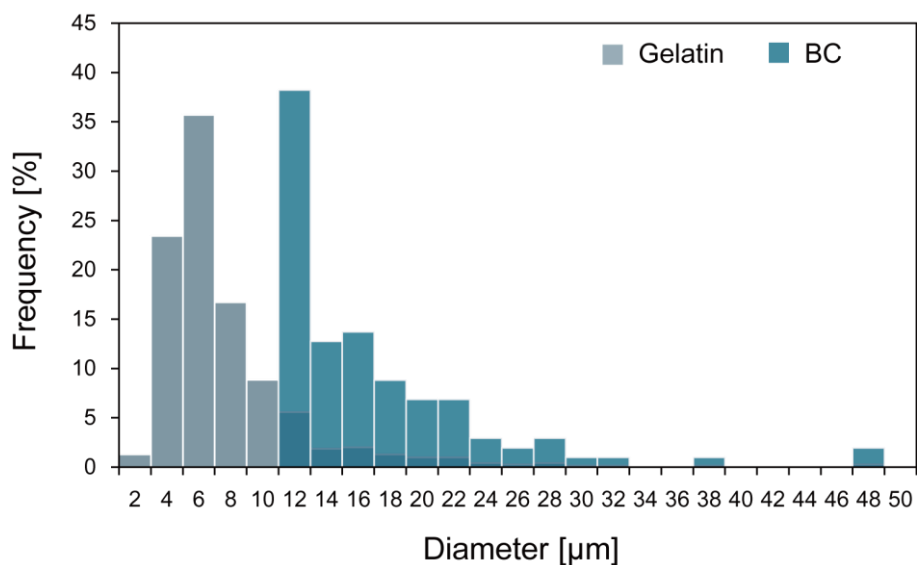


Figure 4.11 Size distribution of gelatin and BC microspheres using emulsification method to prepare the emulsion. Emulsification was conducted under the condition of stirring the two phase liquid at 750 rpm.

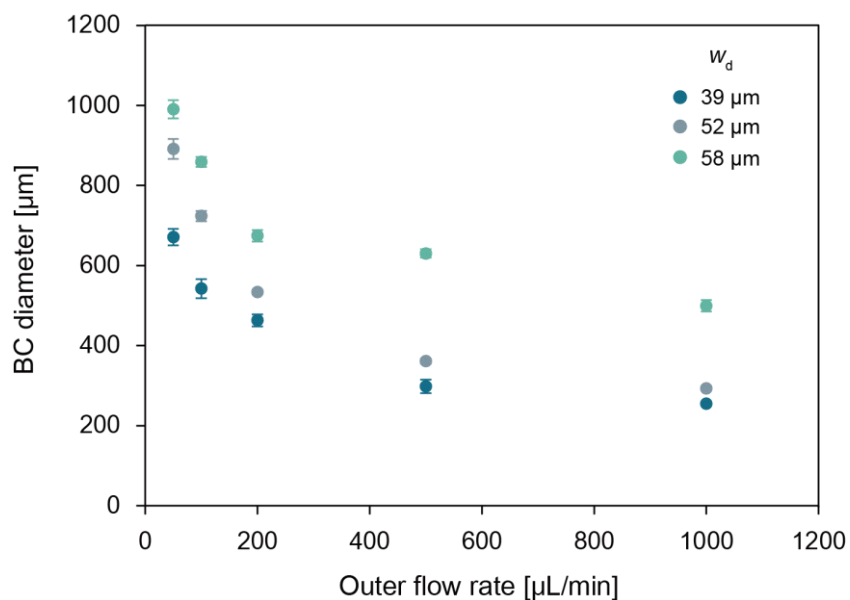


Figure 4.12 Diameters of BC microspheres using the emulsion prepared from the co-flow microfluidic device. Horizontal axis is the corresponding outer flow rate. Error bars represent the standard deviation; sample size  $n > 19$ .

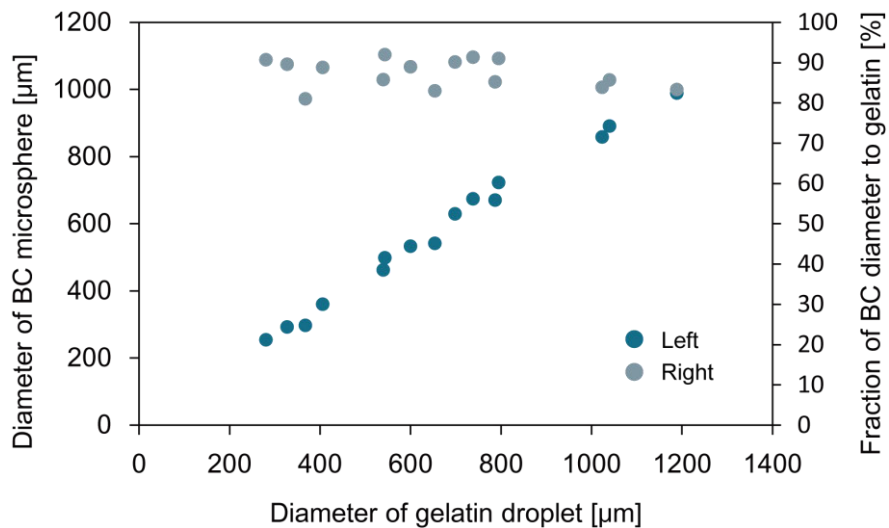


Figure 4.13 Diameter of BC microsphere (left vertical axis) and fraction of BC diameter to gelatin droplet (right vertical axis) as a function of corresponding gelatin droplet diameter using the microfluidic device.

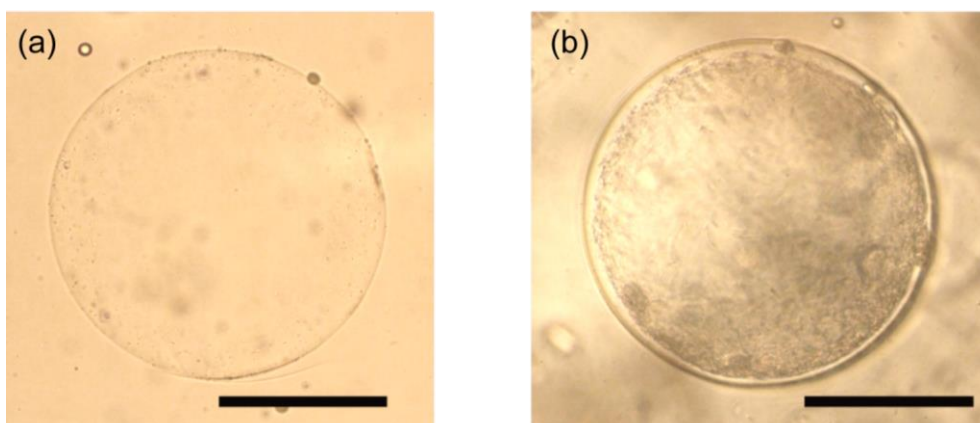


Figure 4.14 Micrographs of BC microspheres (a) at initial state, and (b) after 2-day-cultivation. Scale bars, 200 μm.

## 4.6 結言

本章では、BC から微小球を作製するための新規な成形プロセスを提案した。まず、ゼラチン微小球がコーン油に分散したエマルションを調製するにあたり、界面活性剤である Span 80 の使用量を決定した。乳化法により調製されたエマルションを安定化指標の ESI を用いて評価した結果、3.0 wt%以上の濃度でエマルションが安定化することがわかった。過剰な界面活性剤の添加は不安定化を招くことが理論的に予測され、またコストを不要に増加させる。したがって、提案のプロセスでは界面活性剤の濃度として 3.0 wt%を用いた。

エマルションの調製には乳化法とマイクロ流体法を用いた。乳化法によって調製されたエマルションの最小粒径は約 2  $\mu\text{m}$  であったが、得られた BC 微小球の最小粒径は約 10  $\mu\text{m}$  であったことから、提案のプロセスによって成形可能な最小粒径は 10  $\mu\text{m}$  程度であると推測される。これは、BC のナノファイバが絡み合い、ゲルを形成するために一定の大きさの空間が必要であるためと考えられる。

マイクロ流体法を用いて調製したエマルションの粒径は、4.4.2 の半理論式とおおよそ適合することが分かり、粒径の予測が可能であることが示された。また、エマルション粒径の CV 値は全ての条件で 4%未満であり、生成されたエマルションの単分散性が示された。このエマルションを用いて成形された BC 微小球も、同様に単分散性を示した一方、大きさがエマルション粒径の 80-90%と小さくなった。したがって、BC 微小球の粒径を正確に制御する必要がある場合、この粒径の減少を考慮して成形を行う必要がある。



## 第5章

# ハイドロゲルチューブによる屋外培養法

### 5.1 緒言

CNF の実用化には、より安価な生産方法が求められる。CNF は BC 産生菌の培地中に CMC-Na を添加することでも得ることができ、BC 産生菌は価格競争力を有した CNF 産生源となりうる。しかし、BC 産生細菌の培養コストは依然として高い。付加価値の低い構造材料としての利用を考えると、現在の BC 生産技術に価格競争力はない。本章では、この問題を解決するため、ハイドロゲルの中空チューブ内に微生物を包括することで、生物汚染を防ぐことできる、新規な培養プロセスの提案および概念実証実験を行う。

### 5.2 従来の屋外培養法

培養方法は開放系と閉鎖系に分けることができ、それぞれに長所と短所がある (Table 5.1)。微生物の培養による目的物質の生産コストは、変動費と固定費からなる。このうち、変動費には培地のコスト、分離精製に必要な溶媒などの消耗品コストおよび光熱費などのユーティリティコストが主なものとして挙げられる。また、廃水や廃棄物の処理コストも場合によっては生産コストの 1/3 を占め、無視できない。固定費には、設備投資による減価償却費と人件費が主な要因である。これらを考えると、多額の設備投資を要さず、スケールアップも容易な屋外培養は理想的には生産コストを劇的に下げることができる。しかし、屋外培養では温度などの環境制御を空間全体にわたって均一に行うことが難しく、また周囲から侵入する競合微生物による生物汚染も容易に発生する。これによって、著しく収量が下がり、結果的に閉鎖系よりも生産コストが高くなる場合が多い。

こうした問題を解決するため、これまでに様々な屋外培養技術が開発されてきた。一つのアプローチは、硫酸キニーネ[103, 104]やロテノン[105]、水酸化アンモニウム[106]といった化学添加物を使用することである。しかし、この方法は目的とする微生物の増殖も妨げる場合が多く、また残存する添加物の除去に費用がかかる。別の方法としては、高塩濃度や高ア

ルカリ性の培地を用いることであるが，使用可能な株を大きく限定する[107]．最後の方法は，pHを一時的に下げるなど，目的微生物の増殖速度を増加させるよう培養条件を制御することである[108]．このアプローチは様々な微生物に適用されるが，屋外において大規模に環境を制御するための設備投資費は莫大なものとなる．

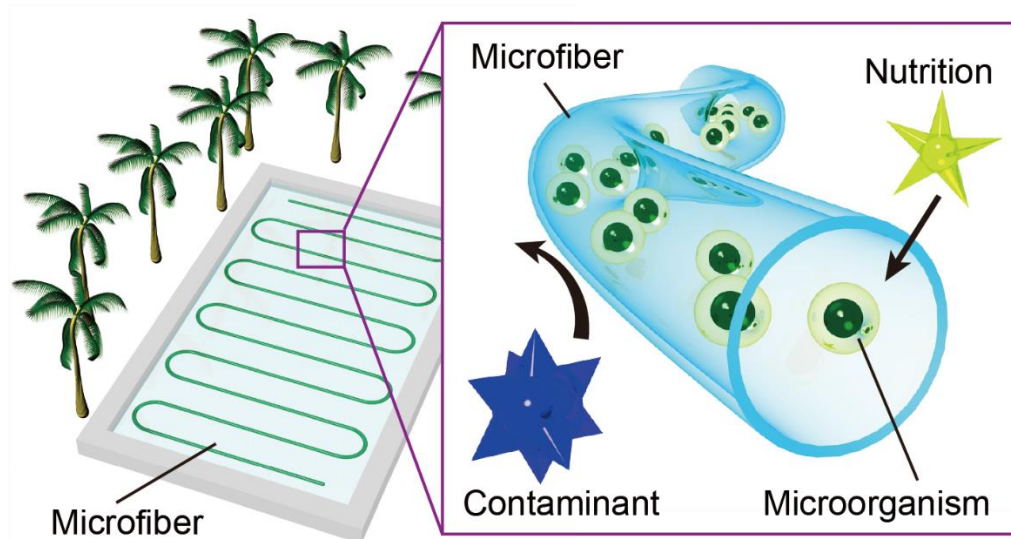
Table 5.1 Comparison between closed and open systems based on the ref. [109]

Assessment factor	Closed systems	Open systems
Contamination control	Easy	Difficult
Contamination risk	Reduced	High
Sterility	Achievable	None
Process control	Easy	Difficult
Mixing	Uniform	Very poor
Investment	High	Low
Operation costs	High	Low
Temperature control	More uniform	Difficult
Productivity	High	Low

### 5.3 本研究で提案する手法

屋外培養において大きなリスクファクターである生物汚染の問題を解決するため、チューブ状の半透膜で微生物を包括する新たな培養方法を提案する。以下では、このチューブを微生物チューブと表記する。ハイドロゲルなどの半透膜は、微生物の栄養素や酸素、老廃物を透過するとともに、ウイルスを含む微生物の通過を妨げる。したがって、培養対象の目的微生物は微生物チューブ内部に保持され、外部環境に存在する競合微生物からの汚染を防ぐことができる。

想定する微生物チューブの利用形態を Figure 5.1 に示す。まず、汚染のリスクがない製造設備を用いて微生物チューブを生産する。これを、耕作放棄地などの土地へ輸送し、屋外培養を行う。数日間培養したのち、生産された BC を処理設備へ輸送し、分離および回収ののち洗浄することで BC を得ることができる。なお、回収の際に分離された BC 産生細菌は再び微生物チューブの製造に再利用できる。



s

Figure 5.1 Conceptual schematic of the hollow hydrogel microfiber containing microorganisms in open cultivation system. Due to the pore size of the hydrogel, nutrition passes through the fiber while contaminants are prevented from entering the fiber.

## 5.4 理論

微生物チューブを作製するため、4.4 で使用したものと同様の同軸流デバイスを用いる。ガラスノードル部から細菌の懸濁液、もう一方の入り口からアルギン酸ナトリウム水溶液を流入させると、コネクタ出口部で同軸2層流が形成される。この流れを塩化カルシウム溶液中に導くことで、細菌を内包した中空のアルギン酸カルシウムゲルファイバを作製することができる。

半径  $R$  の円管内を流れる体積流量  $q$  の発達した層流は、ハーゲン・ポアズイユ流れと呼ばれ、円管中心から  $r$  離れた位置での速度  $V(r)$  は

$$V(r) = \frac{2q}{\pi R^2} \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) \quad (5.1)$$

と表せる。

細菌懸濁液 (コア層) の流量を  $q_i$ 、アルギン酸ナトリウム水溶液 (シェル層) の流量を  $q_o$  とし、コア層とシェル層の半径をそれぞれ  $R_i$ 、 $R_o$  とすると、

$$\begin{aligned} q_i &= \int_0^{R_i} V(r) 2\pi r dr \\ &= \frac{4q}{R_o^2} \left( \frac{R_i^2}{2} - \frac{R_i^4}{4R_o^2} \right) \end{aligned} \quad (5.2)$$

ここで、 $q = q_i + q_o$  である。式 (5.2) を  $R_i$  について解くと、

$$R_i^2 = R_o^2 \pm \sqrt{R_o^4 - \frac{R_o^4 q_i}{q}} \quad (5.3)$$

$$= R_o^2 \left( 1 \pm \sqrt{1 - \frac{q_i}{q}} \right) \quad (5.4)$$

ここで、 $0 < R_i < R_o$  より

$$\frac{R_i}{R_o} = \sqrt{1 - \sqrt{\frac{1}{q_i/q_o + 1}}} \quad (5.5)$$

とコア層の半径が表せる。したがって、ファイバのコア層とシェル層の半径比、または直径比は体積流量比のみの関数となり、デバイスの幾何学構造によらない値となる。

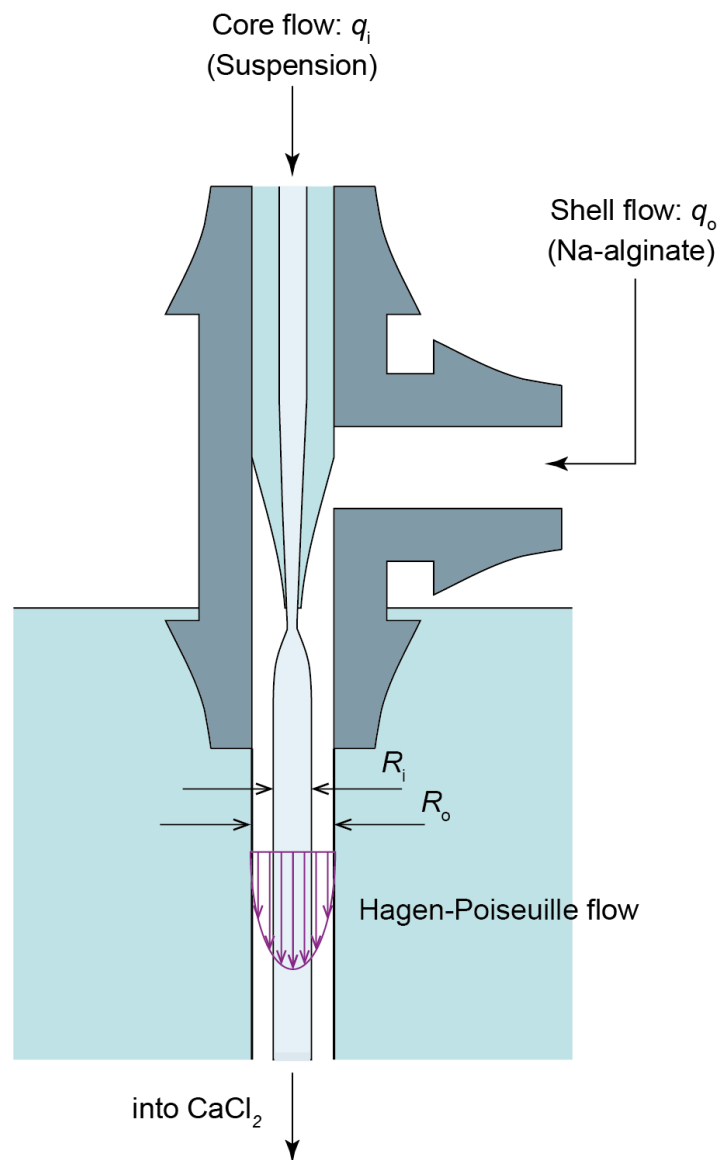


Figure 5.2 Formation of the microfiber using a co-flow microfluidic device. The bacterial suspension is introduced from a hollow glass needle with an inner diameter of  $100 \mu\text{m}$  at the tip. From the other inlet, sodium alginate solution is introduced. The produced coaxial laminar flow is extruded into calcium chloride solution, resulting in the hollow microfiber of calcium alginate hydrogel.

## 5.5 実験

### 5.5.1 微生物チューブの形成

4.4 で使用したものと同様の同軸流デバイスを用いて、中空チューブを作製した。ただし、用いたデバイスのガラスニードルの先端内径は  $150\ \mu\text{m}$  で外径は  $400\ \mu\text{m}$  のものを使用した。また、ポンプはコア相、シェル相ともにシリンジポンプを使用した。シェル層には、 $1.5\ \text{wt}\%$  アルギン酸ナトリウム水溶液を使用し、同軸 2 層流を  $150\ \text{mM}$  塩化カルシウム溶液中に吐出することで中空チューブを得た。なお、T 字コネクタの出口には内径  $1.5\ \text{mm}$ 、外径  $2.5\ \text{mm}$  のシリコンチューブ (アズワン株式会社) を接続し、これが塩化カルシウム溶液まで同軸 2 層流を導き、出口部にて中空チューブを形成する。

Figure 5.3 は青色蛍光粒子をコア層に、緑色蛍光粒子をシェル層に含んだ中空チューブの蛍光顕微鏡画像である。図からわかるように、コア層とシェル層が明確に分かれた中空のファイバが形成されている。

次に、流速比を変化させることで、コアとファイバ膜厚の制御をおこなった。このとき、流速比  $q_i/q_o$  が 1 を越えると流れが不安定化し、チューブが作製できなかった。したがって、流速比が 1 より小さくなる範囲の体積流量を用いた。また、流速比が小さ過ぎるとアルギン酸ナトリウム溶液がガラスニードルへ逆流するため、流速比が 0.01 以上となるような体積流量を用いた。さらに、総流量が小さ過ぎると生産性が低く、産業利用には不適當となる。したがって、総体積流量が  $100\ \mu\text{L}/\text{min}$  を越えるようにした。

結果を Figure 5.4 に示す。このグラフからわかるように、シェル層の流速  $q_o$  が一定下では、コア層流速  $q_i$  を増加させると、チューブの内径、外径ともに増加する。内径の増加割合は外径の増加割合より大きく、膜厚は  $q_i$  の増加にともない減少する。これらを  $q_i/q_o$  を横軸に、液滴径比  $d_i/d_o$  を縦軸にまとめた結果を Figure 4.5 に示す。式 (5.5) から計算した理論値と比較すると、液滴径比は理論値よりも大きくなっている。この原因として、本システムでは同軸 2 層流が流路内でゲル化せず、出口部で塩化カルシウムと接することでゲル化するためであると考えられる。出口から同軸 2 層流が流出する際、アルギン酸ナトリウム溶液は広がりながらゲル化する。この広がり度合いは、総流量に依存することが知られている[110]。本実験においても、この傾向がみられたが (Figure 5.6)、増加の割合は線形ではなく、また塩化カルシウム溶液に吐出される流路出口の外径および濡れ性の影響を受ける。これが理論値とのずれの原因であると考えられ、本システムで所望の外径と膜厚を有するファイバを得るには、個別のシステムごとに実験的な膜厚測定が必要であると思われる。

次に、微生物を培養する上で最適な膜厚を決定するため、*Corynebacterium glutamicum* (NBRC 12168) を内包した微生物チューブを様々な膜厚で作製した。*C. glutamicum* は棍棒状のグラム陽性菌であり、L-グルタミン酸ナトリウム生成菌として産業的に広く用いられている。*C. glutamicum* の培地を Table 5.2 に示す。*C. glutamicum* は代謝の老廃物として乳酸を生

成するため、その濃度を測定することにより代謝速度を評価することができる。生成された乳酸は、薬剤 F-kit (L-Lactic acid, Roche Diagnostics) と UV-Vis により測定した。

*C. glutamicum* を内包した微生物チューブを 2 時間、20 mL の培地により培養し、乳酸の濃度を測定した。結果を Figure 5.7 に示す。これより膜厚が 120  $\mu\text{m}$  までは乳酸濃度はほとんど変化しないが、膜厚が 120  $\mu\text{m}$  を上回ると急激に減少することがわかる。微生物チューブを用いずに培養を行ったコントロール実験では、乳酸濃度が 21 mg/L であったことから、膜厚が有意に細菌の代謝へ影響を及ぼすことがわかった。これは、半透膜を介した基質の輸送速度が膜厚による影響を大きく受けるためであると考えられる。物質輸送速度  $dM/dt$  は、半透膜実質部分の拡散と細孔内拡散の両者に支配され、以下の式で表される。

$$\frac{dM}{dt} = \frac{S(1 - \varepsilon)D_n P (C_{\text{outside}} - C_{\text{inside}})}{h} + \frac{S\varepsilon D_p (C_{\text{outside}} - C_{\text{inside}})}{h\tau}$$

ここで、 $S$  は放出面積、 $D_n$  は栄養素の膜実質部分の拡散係数、 $D_p$  は栄養素の細孔内での拡散係数、 $P$  は膜表面と培地間の分配係数、 $C_{\text{outside}}$  は培養液中の栄養素濃度、 $C_{\text{inside}}$  は微生物チューブ内の栄養素濃度、 $h$  はチューブ膜厚である。また、 $\varepsilon$  は膜の空隙率、 $\tau$  は細孔の曲路率である。この式より、輸送速度は膜厚  $h$  に反比例するため、チューブ内の細菌に供給される基質が膜厚の増加に伴って急激に低下し、Figure 5.7 のような代謝速度の急峻な低下につながったものと考えられる。

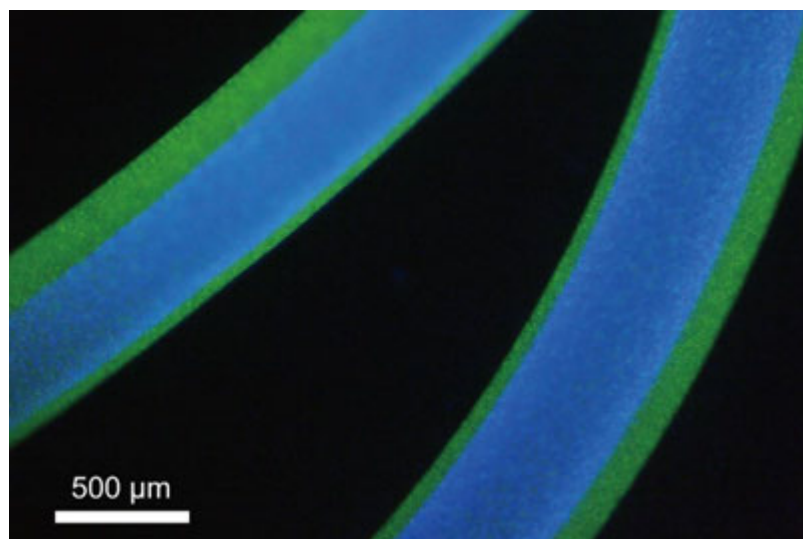


Figure 5.3 Merged fluorescent micrograph of the hollow hydrogel microfiber colored with blue and green fluorescent particles for the core and the shell region, respectively.

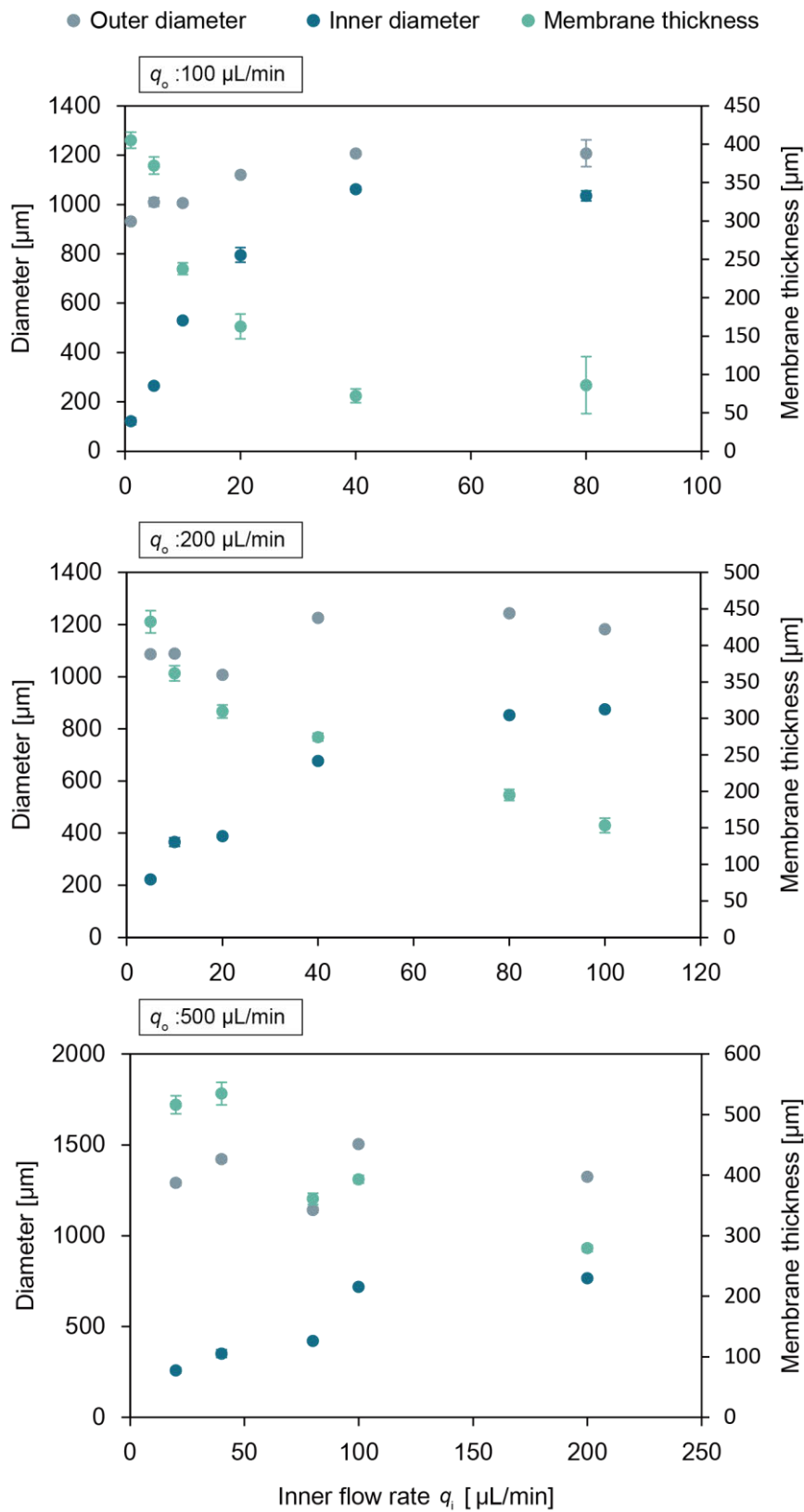


Figure 5.4 Inner and outer diameter of the microbial tube (left axis), and the membrane thickness of the tube (right axis) as a function of inner flow rate.



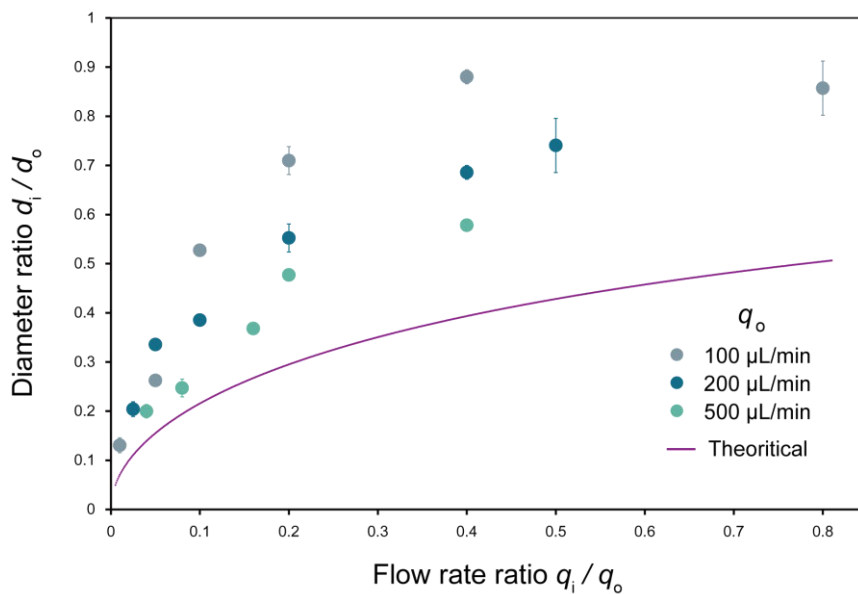


Figure 5.5 Diameter ratio of the microbial tube as a function of the flow rate ratio at various outer flow rate. The solid curve was calculated using Eq. (5.5).

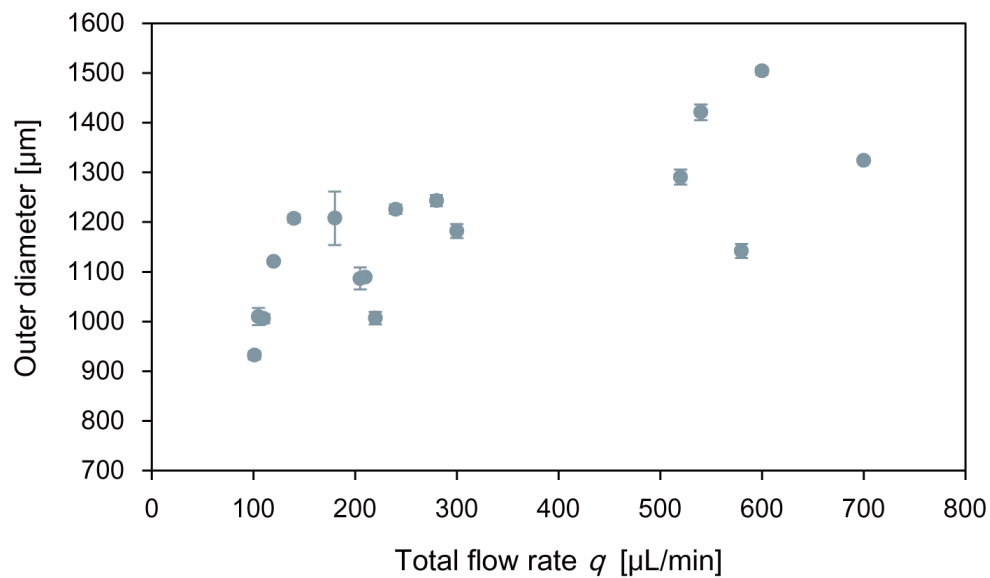
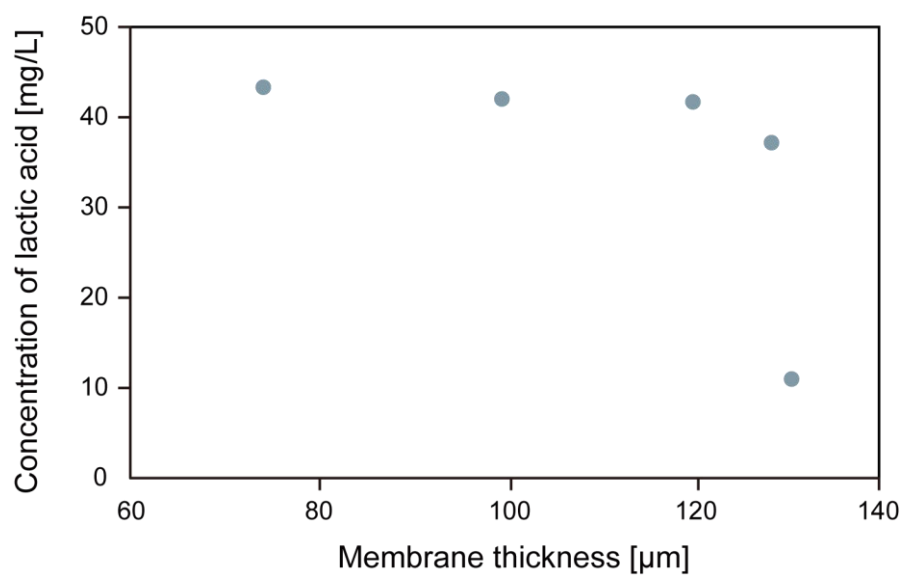


Figure 5.6 Outer diameter of the microbial tube as a function of total flow rate.

Table 5.2 Composition of culture medium for *C. glutamicum*.

Component	Amount
Polypepton	10 g
Yeast extract	2 g
MgSO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O	2 g
DI water	1 L

Figure 5.7 Concentration of the lactic acid produced by *C. glutamicum* as a function of the membrane thickness of the microfiber.

### 5.5.2 微生物の培養

微生物チューブが、競合微生物からの保護を可能にすることを示すため、実証実験を行った。まず、同軸2層流デバイスにより *C. glutamicum* を内包した微生物チューブを作製した。また、コントロールとして微生物チューブを用いず、*C. glutamicum* の培地で、*C. glutamicum* を培養し、両者の増殖速度を比較した。なお、細菌濃度は所定の経過時間ごとにピペッティングにて *C. glutamicum* を取り出し、C-チップにて計測した。*C. glutamicum* の菌体濃度の時間変化を Figure 5.8 に示す。微生物チューブ内で培養した *C. glutamicum* の濃度はコントロールよりも急速に増加し、培養 9 時間では微生物チューブにおける細菌濃度がコントロールの約 5 倍となった。これは、微生物チューブを用いた培養では細菌の絶対数がコントロールよりも少なく、基質濃度の減少も緩やかであるために、*C. glutamicum* の増殖速度が大きかったためと考えられる。

次に、微生物チューブにより目的微生物を競合微生物から保護可能であることを示すため、目的微生物と競合微生物を共培養した。まず、あらかじめ *C. glutamicum* の懸濁液を内包した微生物チューブを作製したのち、微生物チューブ内で目的微生物を培養し、*Vibrio alginolyticus* (NBRC 15630) を含んだ *C. glutamicum* の培地に浸漬した。*V. alginolyticus* は海洋性の運動性細菌であり、*C. glutamicum* との識別が容易であることから用いた。*V. alginolyticus* は、共培養の前に Table 5.3 に示す培地で培養した。また、コントロール実験として微生物チューブを用いず、*C. glutamicum* の培地内で *C. glutamicum* と *V. alginolyticus* を共培養し、両微生物の増殖速度を比較した。結果を Figure 5.9 に示す。

このグラフより、微生物チューブを用いることで、競合微生物存在下においても目的微生物の培養が可能であることが確認できた。

Table 5.3 Composition of culture medium for *V. alginolyticus*.

Component	Amount
Polypepton	10 g
Yeast extract	2 g
MgSO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O	1 g
DI water	250 mL
Daigo sea water	750 mL

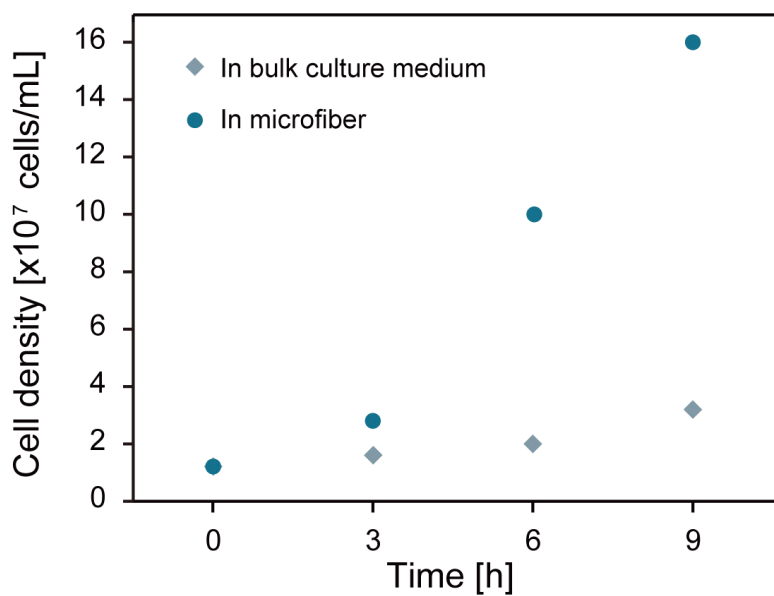


Figure 5.8 Cell density of *C. glutamicum* as a function of culture time. The measurements were conducted every 3 h for both conditions.

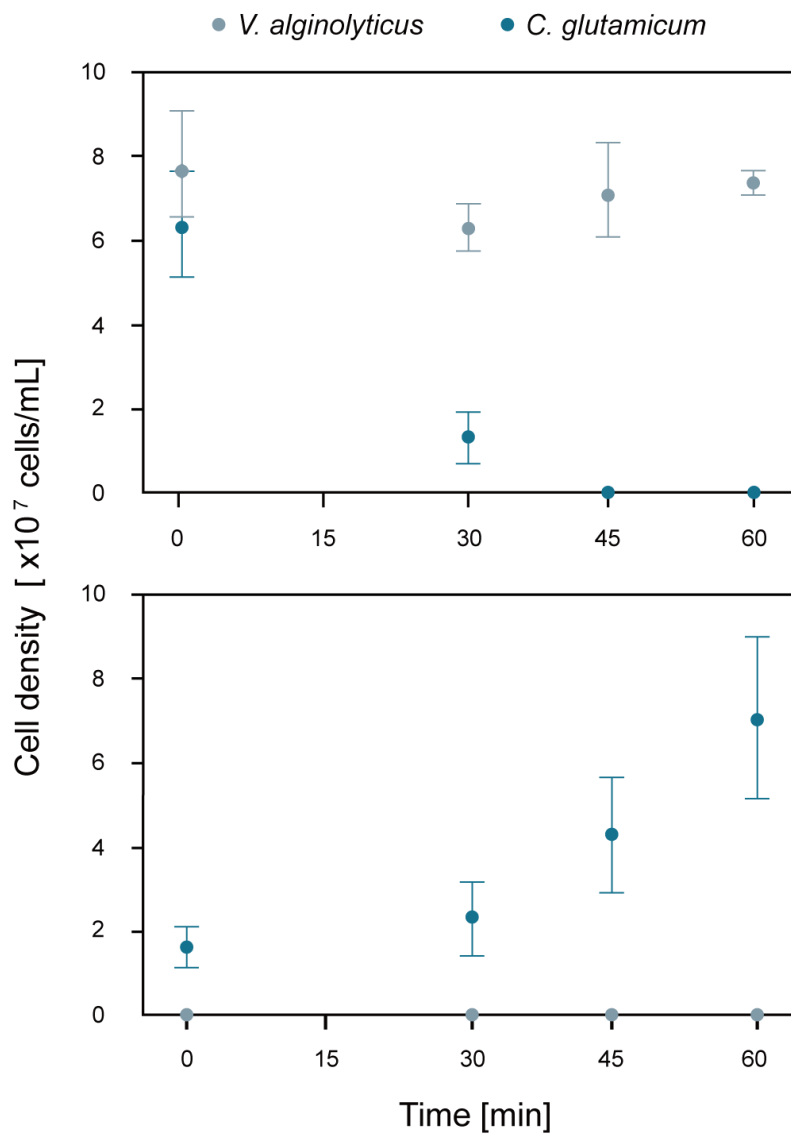


Figure 5.9 Cell densities of *C. glutamicum* and *V. alginolyticus* (top) without the microfibers and (bottom) in the microfiber exposed to a suspension containing *V. alginolyticus* as a function of culture time. Error bars represent standard deviation; sample size  $n = 3$ .

### 5.5.3 微生物チューブの高強度化

アルギン酸カルシウムゲルは加工が容易で安価であるが、化学的安定性と機械的強度が低い。実際、培養実験において微生物チューブを数時間培地に浸漬すると、微生物を回収する際にチューブが容易に破壊され、ハンドリング性に課題がみられた。これは、分子鎖間のカルシウムイオンが経時的に培地中へと散逸し、イオン結合が解消されたためと考えられる。微生物チューブを屋外で培養する場合、より長期の培養時間が必要になると考えられるため、微生物チューブの高強度化が求められる。そこで、アルギン酸カルシウムゲルにポリアクリルアミドゲルを混合した DN ゲルを用い、微生物チューブ高強度化の可能性について調べた。

DN ゲルとは 2003 年に Gong らにより開発された高強度ゲルであり、相互侵入 2 重網目構造を有する。一般的に、希薄で伸張しきった網目を有する脆い第 1 網目と、濃厚で縮んだ網目をもった柔軟な第 2 網目から成り、前者が犠牲結合、後者が隠れ長の役割を果たす。DN ゲルの高強度化原理は、伸張性が極めて大きいマトリックス中に、脆い犠牲結合を導入することで達成されるとされ、「犠牲結合と隠れ長」理論と呼ばれる。これは、高い伸張性を有する「隠れ長」網目を伸び切らせて破断させるまでに、亀裂周囲に存在する脆い犠牲結合の破壊にエネルギーが費やされ、最終的なゲルの破断に要するエネルギーが膨大になるという考え方である。

この原理に基づき[111], Suo らは 2012 年にアクリルアミドとアルギン酸カルシウムを利用した DN ゲルを開発した[112]。このゲルは Figure 5.10 のような構造をもつ。アクリルアミドとアルギン酸カルシウムによる DN ゲルは、2 種類のハイドロゲルの混合比によって強度が大きく変化する。そこで、本研究では複数の混合比率でチューブの溶液を調製した。なお、すべての混合比率においてペルオキシ硫酸アンモニウム (APS) は 5.1 mM, N,N,N',N'-Tetramethyl-1, 2-ethanediamine (TEMED) は 8.6 mM となるよう調製した。また、アルギン酸ナトリウム (粘度範囲 : 80-120 cp (10 g/L, 20°C)) および塩化カルシウムは和光純薬工業株式会社から、アクリルアミド溶液 (30 w/v%-アクリルアミド/ビス混合液 (29:1)) , APS および TEMED はナカライテスク株式会社から購入した。

コア層の入り口流路から菌懸濁液、シェル層の入り口流路からアルギン酸ナトリウムとアクリルアミド溶液、APS の混合溶液をシリンジポンプにより流入させ、出口にて塩化カルシウム (150 mM) と TEMED (8.6 mM) の混合溶液へ吐出することで、DN ゲルによる微生物チューブを作製した。なお、体積流量はコア層 100  $\mu$ L/min, シェル層 1000  $\mu$ L/min とした。

まず、作製したチューブの機械強度を引張試験により測定した。ここで、産業的に微生物チューブを用いる上で、強度上問題になるのは瞬間的に加わる応力であると想定されるため、評価指標として破断応力を用いた。破断応力不十分であると、微生物回収時に微生物チューブが破断し、微生物がチューブ外に流れ出てしまう可能性や、培養中のコンタミ

ネーションといった危険性が考えられる。

引張試験には高い分解能を持ち、様々な形状のポリマーの固定が可能である RSAIII (TA Instruments Japan Inc.) を用いた。全長 5 mm の試料の片端を固定し、引張速度 0.1 mm/s で試験を行った。DN ゲルを試料に用いて破断応力を求めた。微生物チューブは培地内に浸漬されることで強度が低下する。そこで本実験では、微生物チューブ作製直後 (初期状態) の微生物チューブと、2 時間 *C. glutamicum* の培地に浸漬したのちの微生物チューブに対して引張試験を行い、破断応力を測定した。以下に詳細な実験方法を示す。

- (1) 外径約 1.5 mm, 膜厚が約 100  $\mu\text{m}$  の微生物チューブを作製した。
- (2) それぞれの微生物チューブを、医療用メスを用いて長さ約 10 mm に切断した。
- (3) 微生物チューブの両端を RSAIII のジグに固定した。このとき、微生物チューブが押しつぶされる、または切断されない様注意した。
- (4) 試料が破断するまで、0.1 mm/s の引張速度で試験を行った。このときの応力-ひずみ線図を描き、破断応力を求めた。それぞれのチューブに対し、5 回ずつの引張試験を行った。ゲルをジグで固定する際、ゲルの破損や滑りにより破断応力のばらつきが大きくなる。そこで、5 回のデータから破断応力の最大値と最小値を誤差として抜き、中間 3 回分のデータの平均を試料に用いたチューブの破断応力とした。
- (5) 2 時間培地に浸漬した微生物チューブについても (1)-(4) と同様の手順により、引張試験を行い応力-ひずみ線図を描くことで破断応力を測定した。なお、高分子は引張試験において弾性変形を示す区間が非常に短いため、ひずみが 0%-20% の領域においてはプロット数を約 0.1% ごとに 1 プロットとし、それ以降は約 20% ごとに 1 プロットとした。

初期状態の各混合比での引張試験に関して、代表的なふるまいをしている応力-ひずみ線図を Figure 5.11 に示す。ポリアクリルアミドゲルの混合比率が増加するにしたがって、ひずみと破断応力ともに増加していることから、DN ゲルの形成に成功していると考えられる。

同様に、2 時間培養後の各混合比での引張試験に関しても、代表的なふるまいをしている応力-ひずみ線図を Figure 5.12 に示す。初期状態と同様に、ポリアクリルアミドゲルの混合比率が増加するにつれ、ひずみ、破断応力共に増加していることがわかるが、初期状態と比較すると非常に小さな値となっている。これは、アルギン酸塩成分のカルシウムイオンが放出され、アルギン酸カルシウムゲルの構造が変化することにより機械的強度が低下した

ものと考えられる。また、初期状態の応力-ひずみ線図と比べ、ひずみが 0%-20%の領域において 2 時間培養後のばらつきが増大している。これも培養液に浸漬したことによって、アルギン酸カルシウムゲルの架橋構造が不安定となったことが原因と考えられる。

次に、各混合比と破断応力の関係を Figure 5.13 に示す。初期状態の微生物チューブでは、アルギン酸カルシウムゲルのみで製作した微生物チューブに比べ、DN ゲルではすべての混合比において破断応力の増加が認められた。また、ポリアクリルアミドの混合比が 0 w/v% から増加するに従い破断応力は増加し、92.3%のとき最大値をとることがわかる。しかし、混合比が 94.1%となると、破断応力は低下した。一方、培養 2 時間後の微生物チューブにおいては、アルギン酸カルシウムゲルのみで製作した微生物チューブに比べ、アクリルアミドゲルを混合した DN ゲルを用いた場合は破断応力が大きく、混合比 85.7%で破断応力は最大値を取ることがわかる。これは、培養によってアルギン酸カルシウムゲル中の一部の架橋構造が崩壊し、DN ゲル中のアルギン酸カルシウムとポリアクリルアミドの混合比が変化したためと考えられる。

次に、微生物チューブを用いて *C. glutamicum* を培養し、副生成物である乳酸の生成量を比較することで微生物の増殖速度を評価した。

実験は、まず様々な混合比の DN ゲル微生物チューブ内で *C. glutamicum* を 3 時間培養した。そのうち、*C. glutamicum* の副生成物である乳酸を F-kit (L-Lactic acid, Roche Diagnostics) と UV-Vis 測定により測定した。以下に詳細な実験方法を示す。

- (1) 菌体濃度  $2 \times 10^7$  cells/mL の *C. glutamicum* 懸濁液を 200  $\mu$ L 内包した膜厚約 100  $\mu$ m の微生物チューブを 3 本ずつ作製した。
- (2) それぞれの微生物チューブを 1 本ずつ *C. glutamicum* の培地 20 ml に浸漬し、3 時間培養した。
- (3) 培養後、微生物チューブを浸漬した培養液を攪拌することで乳酸濃度を均一化し、孔径 0.2  $\mu$ m のシリンジフィルタ (Disposable membrane filter unit, Advantech) により微生物チューブ外に漏れ出た *C. glutamicum* を除去した。
- (4) 薬剤 F-kit と UV-Vis 測定により乳酸生成量を測定した。

測定した乳酸の生成量と DN ゲルの混合比の関係を Figure 5.14 に示す。この結果から、アクリルアミドの混合比 66.7%の乳酸生産量が最も多く、アルギン酸カルシウムのみを用いた微生物チューブの乳酸生成量も上回っており微生物の培養効率が最も良いことが考えられる。一方で平均値に対するばらつきが大きく、アルギン酸カルシウムのみを用いた微生物チューブの乳酸生成量に対して、どの混合比率の DN ゲルの微生物培養効率がより優れて



いるのか判断できない。そこで、それぞれの混合比率の群に対してアルギン酸カルシウムの群が有意差を持つかを統計的に調べるため、一元配置分散分析 (ANOVA)を行った。なお、評価は統計ソフト IBM SPSS Statistics (IBM) を用いて行った。

本実験においては、微生物チューブに用いた全ての混合比において、乳酸生成量に有意差が無いという帰無仮説のもと分散分析を行った。分散分析結果を Table 5.4 に示す。この結果、 $p$  値が 0.05 を大きく上回ったため、帰無仮説は棄却できず、有意差あるとはいえない。すなわち、アルギン酸カルシウムとアクリルアミドの混合比は乳酸生成量に対して影響をもつとはいえないことがわかった。

この結果から、単独のアルギン酸カルシウムゲルと DN ゲルは同程度の拡散係数を有し、微生物の培養においてチューブ外環境から栄養素を取り込む能力に差異はないものと考えられる。

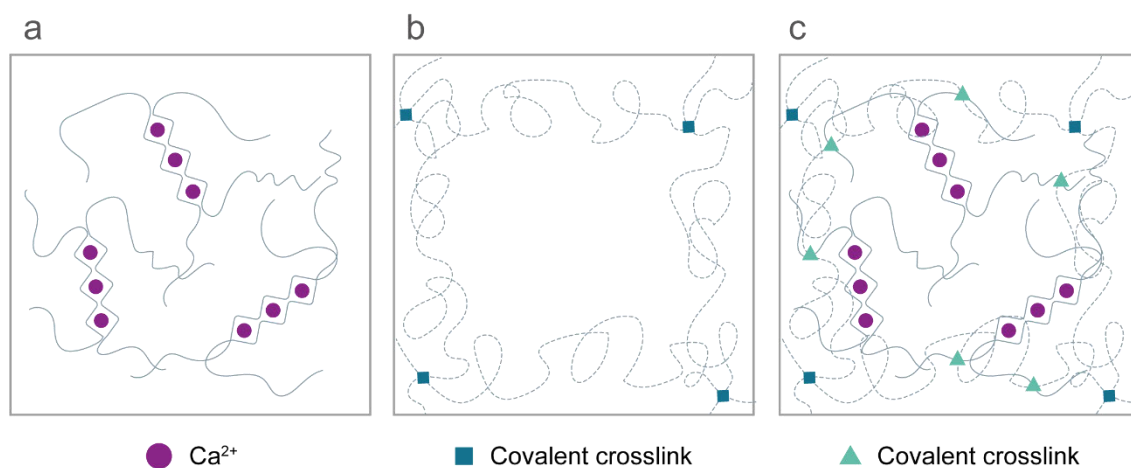


Figure 5.10 Schematics of the double-network hydrogel [112]. (a) The structure of alginate hydrogel where the G blocks on different polymer chains form ionic crosslinks with  $\text{Ca}^{2+}$ . (b) The structure of polyacrylamide gel where the polymer chains form covalent crosslinks with N, N-methylenbisacrylamide (MBAA). (c) The structure of double-network hydrogel where the two polymer networks are intertwined, and joined through covalent cross links between amine groups on polyacrylamide chains and carboxyl groups on alginate chains.

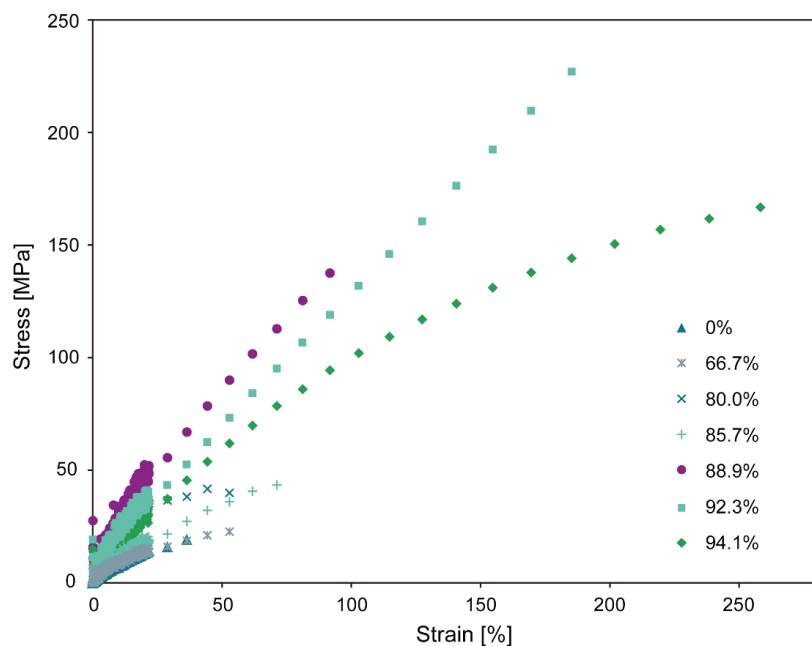


Figure 5.11 Stress-strain curve of the fabricated microbial tube before culture of the bacteria at various weight ratios of acrylamide to acrylamide plus alginate, as shown in the legend.

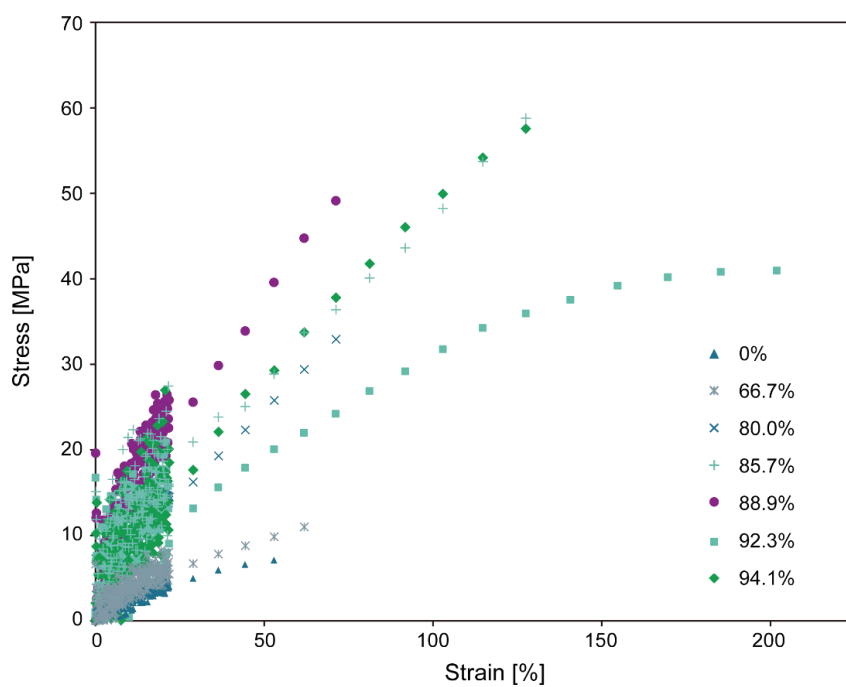


Figure 5.12 Stress-strain curve of the fabricated microbial tube 2h after culture of the bacteria at various weight ratios of acrylamide to acrylamide plus alginate, as shown in the legend.

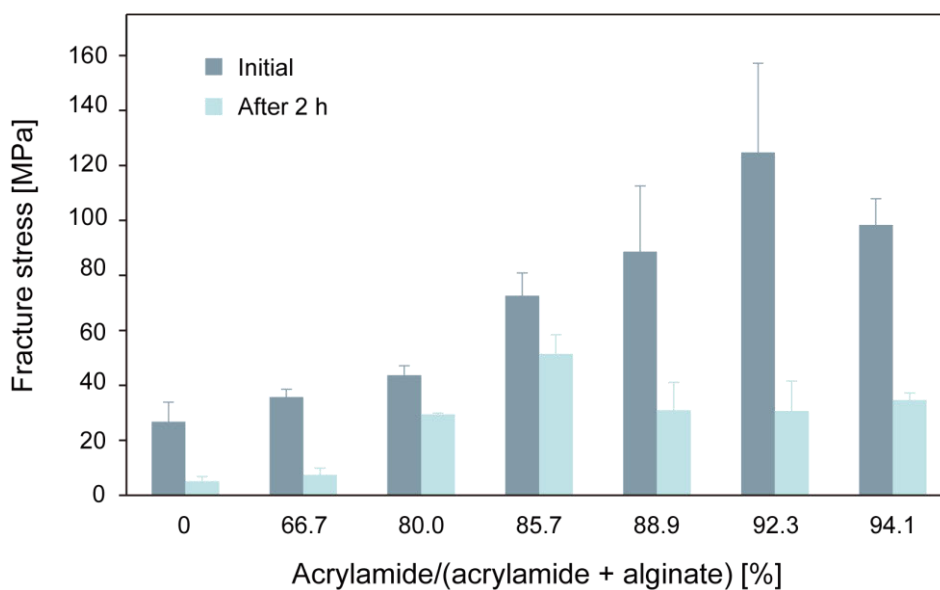


Figure 5.13 Fracture stress of the microfiber due to elongation as a function of the composition ratio of acrylamide and alginate.

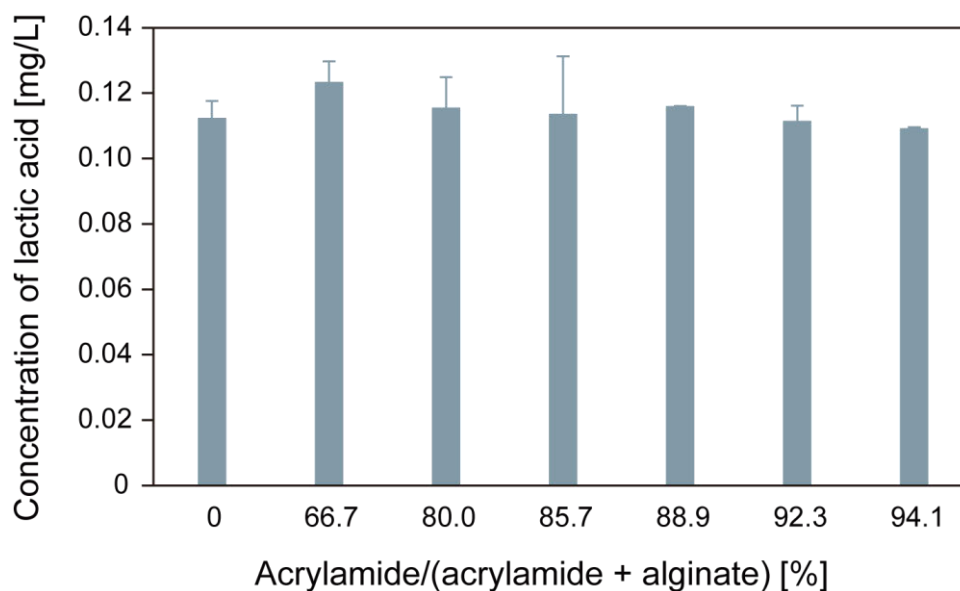


Figure 5.14 Concentration of the lactic acid produced by *C. glutamicum* as a function of the composition ratio of acrylamide and alginate after cultivation for 3 h. Error bars show standard deviation; sample size  $n=3$ .

Table 5.4 Result of ANOVA.

	SS	df	MS	F	P-value
Between groups	0.001	6	0	0.889	P < .528
Within groups	0.002	14	0		
Total	0.002	20			

## 5.6 結言

ハイドロゲルチューブ内部に微生物を封入することで、生物汚染を防ぐ新たな屋外培養法を提案した。4章でも使用したマイクロ流体デバイスを用いることで、様々な膜厚を有するチューブを作製できる。ただし、本研究で用いたシステムでは膜厚の予測式を構築することは困難であると思われる。より正確に膜厚を制御する必要がある場合、T字型コネクタを下流部に1つ追加し、同軸3層流を用いたマイクロ流体デバイスが利用できる[113]。このデバイスでは、流路内部でアルギン酸がゲル化するため、流速の比によって膜厚を制御できる。

微生物培養速度に対する、チューブ膜厚の影響を評価するための実験では、チューブ膜厚が100  $\mu\text{m}$  を越えると急激に微生物培養速度が減少することがわかった。したがって、膜厚は100  $\mu\text{m}$  以下であることが望ましいが、薄すぎると機械的強度が低下し、チューブのハンドリングが困難となる。100  $\mu\text{m}$  以下では微生物培養速度は膜厚によらないことも確認されたため、チューブの膜厚は100  $\mu\text{m}$  が最適値であると考えられる。

概念実証実験として、*C. glutamicum* を目的微生物、*V. alginolyticus* を競合微生物のモデルとして共培養実験を行った。ハイドロゲルチューブなしの共培養では、*C. glutamicum* がほとんど増殖しなかったのに対して、ハイドロゲルチューブ内部に*C. glutamicum* を封入した培養系では、純粋培養と同等の速度で*C. glutamicum* が増殖した。この結果から、提案の培養法が生物汚染を防ぎうることを示された。

アルギン酸カルシウムゲルは、微生物培養の過程においてイオン架橋が解消され、機械的強度が減少する。そこで、ポリアクリルアミドを併用したDNゲルを用いることで、微生物チューブの高強度化を試みた。先行研究において、DNゲルは配合比により強度が大きく変化し、配合比の最適値が存在することが示されており、本研究においても同様の傾向がみられた。ただし、最適な配合比は微生物培養の前後で変化した。これは、イオン架橋の解消によって、ゲルを構成するアルギン酸カルシウムとポリアクリルアミドの比率が変化したためであると考えられる。また、DNゲルを用いて*C. glutamicum* を封入した微生物チューブを作製し、代謝産物である乳酸量を測定したところ、その量は配合比によらないことがわかった。この結果は、DNゲルの栄養物質に対する拡散定数は配合比によらないことを示していると考えられる。

# 第6章

## 結論

### 6.1 結論

本研究では微細加工技術を利用し、BC の産業利用性の向上を目的とした。具体的には、BC の微細成形法を新たに2つ開発した。目的とする形状別に、2つの加工プロセスを提案し、それぞれの方法について、プロセスの評価を行った。また、ハイドロゲルチューブ内部でBC 産生菌を培養する新規な屋外培養法を開発した。本研究の結論を、章ごとに以下に述べる。

#### 第3章 微細構造を有するBC 膜の製作技術

微細構造を有するPDMS 膜を鋳型として用いて、BC 膜上に微細構造を転写するための製作プロセスを開発した。PDMS 膜は、フォトリソグラフィにより製作したSU-8 微細構造の上にPDMS 前駆体を滴下し、スピコートすることにより製作した。PDMS はガス透過率が高いため、PDMS を通してBC 生成に必要な酸素が細菌に供給され、PDMS 鋳型の微細構造がBC 膜に転写される。本章では、以下のことを明らかにした。

- ・5, 10, 20  $\mu\text{m}$  幅の線状パターンをもったPDMS 膜を用いて、本プロセスにより成形可能な最小サイズを評価した。その結果、5, 10, 20  $\mu\text{m}$  全ての構造サイズが製作可能であった。したがって、本プロセスの製作限界はこれらよりも小さいことが明らかになった。
- ・培養時間を変化させることにより、生成されるBC 薄膜の膜厚を約0.1-1.7 mm の範囲で制御できることを確認した。
- ・PDMS 膜の膜厚とBC 膜の膜厚との関係性を評価した。その結果、PDMS 膜厚の増加にともないBC 膜厚が減少することがわかった。これは、BC 産生菌に供給される酸素濃度が、PDMS 膜厚の増加にともなって減少するためであると推測された。

#### 第4章 BC 微小球の製作技術

温度可逆的なゾルーゲル転移を示すゼラチンを犠牲構造として用いることで、BC 微小球を得るためのプロセスを開発した。この犠牲構造となるゼラチン微小球は、乳化法またはマイクロ流体法により作製した。なお、マイクロ流体法には同軸流れ原理による液滴生成デバイスを用いた。本章では、以下のことを明らかにした。

- ・単分散なゼラチンエマルジョンを調製するため、マイクロ流体デバイスを製作した。
- ・マイクロ流体デバイスの条件を変えることで、径約 250-1000  $\mu\text{m}$  の範囲の単分散 BC 微小球を得ることに製作した。
- ・単分散性の評価に用いられる CV 値は、全ての流速について 3% よりも小さく、実用に耐えうるプロセスであることを確認した。

#### 第5章 ハイドロゲルチューブによる屋外培養法

目的微生物を競合微生物から保護しながら屋外培養を行うことができる、新たな培養方法を提案し、その評価を行った。この方法では、ハイドロゲルの中空チューブ内に目的微生物を包括するが、このチューブ作製は第4章で使用したマイクロ流体デバイスを用いて行った。本章では、以下のことを明らかにした。

- ・マイクロ流体法により、目的微生物を封入した微生物チューブの作製に成功した。また、このチューブ膜厚は、流速比によって制御可能であることを確認した。
- ・膜厚が微生物代謝に顕著な影響を及ぼすことを示し、100  $\mu\text{m}$  が膜厚として最適であることを確認した。
- ・微生物チューブ内に目的微生物を封入することで、競合微生物存在下において目的微生物の培養に成功し、新たな屋外培養法としての可能性を示した。
- ・DN ゲルを用いた微生物チューブはアルギン酸カルシウムゲルを用いたハイドロゲルより破断応力が大きく、高強度化することができた。また、初期状態では混合比 92.3% の DN ゲルにおいて破断応力が最大になり、2 時間培養後では混合比 85.7% で破断応力が最大となることがわかった。
- ・DN ゲルを用いた微生物チューブは、アルギン酸カルシウムゲル単独場合と比較して、*C. glutamicum* の乳酸収量に有意差は認められず、培養効率に差異はないことがわかった。

## 6.2 今後の展望

3章で提案したプロセスによって成形可能な最小サイズは、数  $\mu\text{m}$  より小さいことがわかったが、一般的なフォトリソグラフィ技術では、数  $\mu\text{m}$  より小さな構造をつくることは困難であるため、より詳細な評価を行うためには異なる技術を用いて鋳型を作製する必要がある。例えば、電子線リソグラフィでは数百 nm オーダの構造形成が可能であり、同サイズの構造を有する光学素子などが市販されている。これを母型として PDMS 鋳型を作製することで、提案のプロセスが作製できる最小サイズがより正確に評価できると考えられる。ただし、電子顕微鏡ではサンプル作製の際に構造が多少変化することも考えられ、また構造の明確な識別が困難になることも想定される。したがって、構造の評価には原子間力顕微鏡など、ゲル試料を湿潤状態のまま観察でき、かつ深さ方向の情報も取得可能な測定技術を用いることが望ましい。

4章で提案した BC 微小球の成形プロセスでは、犠牲構造として用いられるゼラチン微小球の粒径が、生成される BC 微小球よりも大きいことが示された。この物理的な原理を明らかにし、BC 微小球の粒径がどれだけ減少するのかという定量的な情報が、BC 微小球の粒径を正確に制御する上で求められる。マイクロキャリアや細胞送達技術など、バイオ医療分野への微小球応用を考える上で、この情報は特に重要である。また、BC 微小球は筆者が開発した運動性細菌を駆動源としたマイクロロボットへの応用も可能であると考えられる。提案のプロセスによりサイズが正確に制御された BC の微細構造体を、大量に生産することが可能となり、様々な研究が可能になると考えられる。例えば、マイクロアレイデバイス [114-116] を用いることで、運動性細菌を固定する領域を限定することが可能となると思われる。マイクロアレイデバイスとは、リボソームなど球状の物体を配列的に固定するマイクロ流体デバイスで、典型的な例としては半円状の微細構造に対象物を捕捉する。これにより固定された BC 微小球に運動性細菌を接着させ、接着領域を限定することで、より効率的に運動性細菌を駆動源として利用できると考えられる。

5章で提案した微生物チューブによる屋外培養法では、微生物チューブを用いて BC 産生菌を実際に屋外で培養することができるかを検証する必要がある。この際、微生物チューブにより培養コストを低減できることも合わせて示さなければならないが、微生物チューブ内部を栄養素で満たすと、培地コストと輸送費が押し上げられる。したがって、乾燥状態のチューブを培養する場所へ輸送することが望ましく、これを実現するに新たなハイドロゲルチューブ形成技術が必要となる。例えば、チューブのみを押し出成形などにより先に作製し、次にチューブ内に BC 産生菌を封入する、といったプロセスが考えられる。また、チューブはこの状態で密閉されるため、培養場所にチューブが留置された際に、外部環境からチューブ内部に栄養が取り込まれる機構を設ける必要がある。ただし、この機構を設けるにあたっては、大きな追加コストを費やすことなく、比較的簡便に機構の付与が実現可能であると考えている。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、大変多くの方々にご指導ご協力を賜りましたこと、心より感謝いたします。

本研究は、2015年4月から2017年12月にかけて慶應義塾大学大学院理工学研究科総合デザイン工学専攻マルチディシプリナリ・デザイン科学専修三木研究室で行いました。三木研究室自体には、学部4年生となる2012年4月から所属し、約6年間もお世話になりました。三木研究室に流れる自由闊達な空気と個人個人の考えを重んじる態度は、研究を進行していく上で大きな支えとなりました。そうした素晴らしい環境をつくり上げ、また困難に直面した際には適切な助言を与えてくださった、指導教員の三木則尚教授に、まず感謝の意を表します。国際学会やワークショップをはじめ、自分を成長させる多くの機会を与えて頂いたこと、個人を信頼し、自由に研究を進めさせて下さったことなど、感謝するにきれません。

博士論文審査にて副査をお願い致しました、慶應義塾大学大学院理工学研究科の藤本啓二教授、同大学大学院理工学研究科の宮田昌悟准教授および同大学大学院理工学研究科の尾上弘晃准教授には、それぞれの専門的な視点から多様で有益な意見やご助言を頂き、深い議論を通すことで、本論文の完成度が非常に高まりました。誠にありがとうございました。

また、宮田昌吾准教授と尾上弘晃准教授には実験室を共同利用させて頂き、時には装置を利用させて頂くとともに、装置利用に関する適切な助言を頂きました。

かわさき新産業創造センター (KBIC) には、環境制御走査型顕微鏡や原子間力顕微鏡な高度な実験装置を多く使用させて頂きました。これらの実験装置を日々メンテナンスし、充実した環境を整えて下さった佐藤昇さん、菅野修さん、佐藤友美さん、松垣仁さんに感謝申し上げます。

慶應義塾大学理工学部中央試験所には、粒径分布装置や電界放出形走査型顕微鏡など様々な実験装置を使わせて頂きました。装置の使用方法を丁寧に指導して頂いたおかげで、質の高いデータを短時間で取得することができました。

慶應義塾大学理工学部マニュファクチュアリングセンターには、レーザー加工機や工作機械を使わせて頂きました。装置の使用方法を丁寧に指導して頂き、機械工学科の卒業生として名の恥じぬ技術を身につけることができました。

慶應義塾大学メディアセンターには、大量の書籍を借りさせて頂き、膨大な知識を身につけることができました。品揃えが大変豊富で、長期休暇には何十冊も借りるのが習慣となり、中には返却期限を大きく過ぎてしまうものもありました。この場を借りてお詫び申し上げます。



ます。

慶應義塾大学理工学部学術研究支援課の林伸哉さん、高野道子さんには、日本学術振興会特別研究員 (DC1) としての活動を支えて頂きました。毎度提出する書類に不備があり、ご迷惑をおかけしましたが、辛抱強く丁寧にご対応頂いたことに感謝申し上げます。

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門 (NBRC) には微生物株を分譲して頂き、また微生物培養に関する初歩的な質問や相談に丁寧に対応して頂きました。

三木研究室の OB・OG を含む皆さんには、研究を進める上で助言やモチベーションを頂きました。特に、OB の加野智慎さんには微生物を扱う上での基礎的な知識や技術、そして研究の厳しさを教えてもらうとともに、リーダーとしてのあり方も学ばせて頂きました。また、三木研究室微生物グループの小川実穂さん、藤本和真君、斉藤薫君には、後輩として実験を手伝ってもらったり、よき雑談相手になってもらいました。加野さんのような頼れる先輩ではなかったと思いますが、先輩後輩の垣根なく楽しく過ごさせてもらいました。ただ、整理整頓が苦手なことで迷惑をかけていたことについては深く反省しております。神奈川県立産業技術総合研究所 (KISTEC) に出向していたメンバーとは必然的に交流が少なかったものの、その研究に対する姿勢は先輩後輩問わず非常に尊敬していました。特に、同期の矢菅浩規君の結果を出し続けるストイックな姿勢からはとても刺激を受けました。David Romain 君は分野が全く違ったものの、互いの進捗を話し合うことで見識を広めることができました。これは三木研究室全体にもいえ、幅広い研究を行っている環境であるからこそ、他のメンバーと議論を重ね、時には実験の被験者となり、誰かの代わりに研究の説明を行って行く中で、見識と興味が非常に広まりました。改めて、協力し付き合ってくれたメンバー全員に感謝申し上げます。秘書の神戸典子さんには、三木研究室所属時から最後までお世話になりました。書類関係で度々ご迷惑をおかけしましたが、神戸さんの穏やかな雰囲気は研究生活を送る上で大きな癒しでした。また、三木研究室では研究以外の場でも充実した時間を共有することができました。こうした時間が、精神面で非常に有益な効果をもたらしてくれたことは間違いありません。

大学入学からの友人である土元翔平君と河内比花留君は、全員が博士課程に進むことになり、孤独になりがちな博士課程という世界で生きていく上で、大きな心の拠り所となりました。

最後に、家族に感謝の意を述べたいと思います。The Francis Crick Institute にて、分子生物学に関する研究を行っている兄からは、科学や研究の面白さを教えてもらい、この世界に入る上で大きな影響を与えてもらいました。岐阜大学池田研究室にて薬物送達システムの研究を行っている妹には、英語に苦手意識をもちながらも渡米し、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) で立派に留学を果たした姿に刺激を受けました。幼少期から特に思春期にかけて迷惑をかけっきりの母には、経済面でさらなる追い打ちをかけてしまいました。やりたいことを目一杯できるよう見守ってくれた母に、最大の感謝の意を表し、謝辞の括りと致します。

## 参考文献

- [1] N. Lane and W. Martin, "The energetics of genome complexity," *Nature*, vol. 467, pp. 929-934, Oct 2010.
- [2] M. Tabuchi, K. Watanabe, Y. Morinaga, and F. Yoshinaga, "Acetylation of bacterial cellulose: Preparation of cellulose acetate having a high degree of polymerization," *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, vol. 62, pp. 1451-1454, Jul 1998.
- [3] H. S. Barud, C. A. Ribeiro, M. S. Crespi, M. A. U. Martines, J. Dexpert-Ghys, R. F. C. Marques, *et al.*, "Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 87, pp. 815-818, Mar 2007.
- [4] 亮. 久住, ""機能性セルロース次元材料の開発と応用":近藤 哲男 監修 (シーエムシー出版発行) ," *材料*, vol. 63, p. S6, 2014 2014.
- [5] K. C. Cheng, J. M. Catchmark, and A. Demirci, "Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property," *Cellulose*, vol. 16, pp. 1033-1045, Dec 2009.
- [6] K. C. Cheng, J. M. Catchmark, and A. Demirci, "Effects of CMC Addition on Bacterial Cellulose Production in a Biofilm Reactor and Its Paper Sheets Analysis," *Biomacromolecules*, vol. 12, pp. 730-736, Mar 2011.
- [7] Y. Tomita and T. Kondo, "Influential factors to enhance the moving rate of *Acetobacter xylinum* due to its nanofiber secretion on oriented templates," *Carbohydrate Polymers*, vol. 77, pp. 754-759, Jul 2009.
- [8] K. Hirayama, T. Okitsu, H. Teramae, D. Kiriya, H. Onoe, and S. Takeuchi, "Cellular building unit integrated with microstrand-shaped bacterial cellulose," *Biomaterials*, vol. 34, pp. 2421-2427, Mar 2013.
- [9] F. Tian, H. Hosseinkhani, M. Hosseinkhani, A. Khademhosseini, Y. Yokoyama, G. G. Estrada, *et al.*, "Quantitative analysis of cell adhesion on aligned micro- and nanofibers," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 84A, pp. 291-299, Feb 2008.
- [10] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, and S. Ramakrishna, "Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 26,

- pp. 2603-2610, May 2005.
- [11] D. H. Reneker, W. Kataphinan, A. Theron, E. Zussman, and A. L. Yarin, "Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning," *Polymer*, vol. 43, pp. 6785-6794, Dec 2002.
- [12] K. Ohkawa, D. I. Cha, H. Kim, A. Nishida, and H. Yamamoto, "Electrospinning of chitosan," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 25, pp. 1600-1605, Sep 2004.
- [13] X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 1883-1890, May 2004.
- [14] J. A. Matthews, G. E. Wnek, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, "Electrospinning of collagen nanofibers," *Biomacromolecules*, vol. 3, pp. 232-238, Mar-Apr 2002.
- [15] A. Dufresne, "Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial," *Materials Today*, vol. 16, pp. 220-227, Jun 2013.
- [16] A. Nakayama, A. Kakugo, J. P. Gong, Y. Osada, M. Takai, T. Erata, *et al.*, "High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose," *Advanced Functional Materials*, vol. 14, pp. 1124-1128, Nov 2004.
- [17] G. Helenius, H. Backdahl, A. Bodin, U. Nannmark, P. Gatenholm, and B. Risberg, "In vivo biocompatibility of bacterial cellulose," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 76A, pp. 431-438, Feb 2006.
- [18] A. Bodin, S. Bharadwaj, S. F. Wu, P. Gatenholm, A. Atala, and Y. Y. Zhang, "Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 8889-8901, Dec 2010.
- [19] D. Klemm, D. Schumann, U. Udhardt, and S. Marsch, "Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery," *Progress in Polymer Science*, vol. 26, pp. 1561-1603, Nov 2001.
- [20] K. Higashi and N. Miki, "A self-swimming microbial robot using microfabricated nanofibrous hydrogel," *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 202, pp. 301-306, Oct 2014.
- [21] Y. Z. Wan, Z. W. Yang, G. Y. Xiong, S. R. Raman, and H. L. Luo, "Bacterial cellulose-templated synthesis of free-standing silica nanotubes with a three-dimensional network structure," *Rsc Advances*, vol. 5, pp. 48875-48880, 2015.
- [22] R. T. Olsson, M. Samir, G. Salazar-Alvarez, L. Belova, V. Strom, L. A. Berglund, *et al.*, "Making flexible magnetic aerogels and stiff magnetic nanopaper using cellulose nanofibrils as templates," *Nature Nanotechnology*, vol. 5, pp. 584-588, Aug 2010.
- [23] H. W. Liang, Z. Y. Wu, L. F. Chen, C. Li, and S. H. Yu, "Bacterial cellulose derived nitrogen-doped carbon nanofiber aerogel: An efficient metal-free oxygen reduction electrocatalyst for zinc-air battery," *Nano Energy*, vol. 11, pp. 366-376, Jan 2015.
- [24] F. L. Lai, Y. E. Miao, L. Z. Zuo, H. Y. Lu, Y. P. Huang, and T. X. Liu, "Biomass-Derived Nitrogen-Doped Carbon Nanofiber Network: A Facile Template for Decoration of Ultrathin Nickel-Cobalt

- Layered Double Hydroxide Nanosheets as High-Performance Asymmetric Supercapacitor Electrode," *Small*, vol. 12, pp. 3235-3244, Jun 2016.
- [25] M. Tabuchi, K. Kobayashi, M. Fujimoto, and Y. Baba, "Bio-sensing on a chip with compact discs and nanofibers," *Lab on a Chip*, vol. 5, pp. 1412-1415, 2005.
- [26] M. Tabuchi and Y. Baba, "Design for DNA separation medium using bacterial cellulose fibrils," *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 7090-7093, Nov 2005.
- [27] H. Yano, J. Sugiyama, A. N. Nakagaito, M. Nogi, T. Matsuura, M. Hikita, *et al.*, "Optically transparent composites reinforced with networks of bacterial nanofibers," *Advanced Materials*, vol. 17, pp. 153-+, Jan 2005.
- [28] M. Nogi and H. Yano, "Transparent nanocomposites based on cellulose produced by bacteria offer potential innovation in the electronics device industry," *Advanced Materials*, vol. 20, pp. 1849-+, May 2008.
- [29] H. Ahrem, D. Pretzel, M. Endres, D. Conrad, J. Courseau, H. Muller, *et al.*, "Laser-structured bacterial nanocellulose hydrogels support ingrowth and differentiation of chondrocytes and show potential as cartilage implants," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, pp. 1341-1353, Mar 2014.
- [30] H. Backdahl, M. Esguerra, D. Delbro, B. Risberg, and P. Gatenholm, "Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 2, pp. 320-330, Aug 2008.
- [31] A. Putra, A. Kakugo, H. Furukawa, J. P. Gong, and Y. Osada, "Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface," *Polymer*, vol. 49, pp. 1885-1891, Apr 2008.
- [32] Y. Hu and J. M. Catchmark, "Formation and Characterization of Spherelike Bacterial Cellulose Particles Produced by *Acetobacter xylinum* JCM 9730 Strain," *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 1727-1734, Jul 2010.
- [33] A. Putra, A. Kakugo, H. Furukawa, J. P. Gong, Y. Osada, T. Uemura, *et al.*, "Production of bacterial cellulose with well oriented fibril on PDMS substrate," *Polymer Journal*, vol. 40, pp. 137-142, 2008.
- [34] A. Vazquez, M. L. Foresti, P. Cerrutti, and M. Galvagno, "Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*," *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 21, pp. 545-554, Jun 2013.
- [35] M. Hofinger, G. Bertholdt, and D. Weuster-Botz, "Microbial Production of Homogeneously Layered Cellulose Pellicles in a Membrane Bioreactor," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 108, pp. 2237-2240, Sep 2011.
- [36] M. Florea, H. Hagemann, G. Santosa, J. Abbott, C. N. Micklem, X. Spencer-Milnes, *et al.*, "Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, pp. E3431-E3440, Jun 2016.

- [37] L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. L. Lin, R. Barretto, N. Habib, *et al.*, "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems," *Science*, vol. 339, pp. 819-823, Feb 2013.
- [38] C. J. Bettinger, R. Langer, and J. T. Borenstein, "Engineering Substrate Topography at the Micro- and Nanoscale to Control Cell Function," *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 48, pp. 5406-5415, 2009.
- [39] F. Guilak, D. M. Cohen, B. T. Estes, J. M. Gimble, W. Liedtke, and C. S. Chen, "Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix," *Cell Stem Cell*, vol. 5, pp. 17-26, Jul 2009.
- [40] D. Hoffman-Kim, J. A. Mitchel, and R. V. Bellamkonda, "Topography, Cell Response, and Nerve Regeneration," in *Annual Review of Biomedical Engineering, Vol 12*. vol. 12, M. L. Yarmush, J. S. Duncan, and M. L. Gray, Eds., ed Palo Alto: Annual Reviews, 2010, pp. 203-231.
- [41] M. Nikkhah, F. Edalat, S. Manoucheri, and A. Khademhosseini, "Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface," *Biomaterials*, vol. 33, pp. 5230-5246, Jul 2012.
- [42] H. N. Kim, A. Jiao, N. S. Hwang, M. S. Kim, D. H. Kang, D. H. Kim, *et al.*, "Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, pp. 536-558, Apr 2013.
- [43] 保. 丹治, 正. 今井, 正. 養王田, 博. 荻野, 肇. 海野, and 一. 中西, *生物化学工学*, 第 3 版 ed.: 講談社, 2011.
- [44] Marxfigi.M and B. G. Pion, " Kinetic Investigations on Biosynthesis of Cellulose by *Acetobacter-Xylinum*," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 338, pp. 382-393, 1974.
- [45] T. Naritomi, T. Kouda, H. Yano, and F. Yoshinaga, "Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture," *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 85, pp. 598-603, 1998.
- [46] R. M. Brown, J. H. M. Willison, and C. L. Richardson, " Cellulose Biosynthesis in *Acetobacter-Xylinum* - Visualization of Site of Synthesis and Direct Measurement of Invivo Process," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, pp. 4565-4569, 1976.
- [47] M. Schramm and S. Hestrin, " Factors Affecting Production of Cellulose at The Air Liquid Interface of a Culture of *Acetobacter-Xylinum*," *Journal of General Microbiology*, vol. 11, pp. 123-&, 1954.
- [48] S. Valla and J. Kjosbakken, "Cellulose-Negative Mutants of *Acetobacter-Xylinum*," *Journal of General Microbiology*, vol. 128, pp. 1401-1408, 1982.
- [49] W. S. Williams and R. E. Cannon, "Alternative Environmental-Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter-Xylinum*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 55, pp. 2448-2452, Oct 1989.

- [50] M. Iguchi, S. Yamanaka, and A. Budhiono, "Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts," *Journal of Materials Science*, vol. 35, pp. 261-270, Jan 2000.
- [51] セルロース学会, *セルロースの事典*: 朝倉書店, 2000.
- [52] J. H. Ha, N. Shah, M. Ul-Islam, T. Khan, and J. K. Park, "Bacterial cellulose production from a single sugar alpha-linked glucuronic acid-based oligosaccharide," *Process Biochemistry*, vol. 46, pp. 1717-1723, Sep 2011.
- [53] W. Y. Liu, S. Thomopoulos, and Y. N. Xia, "Electrospun Nanofibers for Regenerative Medicine," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 1, pp. 10-25, Jan 2012.
- [54] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review," *Tissue Engineering*, vol. 12, pp. 1197-1211, May 2006.
- [55] C. P. Barnes, S. A. Sell, E. D. Boland, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, "Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, pp. 1413-1433, Dec 2007.
- [56] A. Martins, M. L. A. da Silva, S. Faria, A. P. Marques, R. L. Reis, and N. M. Neves, "The Influence of Patterned Nanofiber Meshes on Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis," *Macromolecular Bioscience*, vol. 11, pp. 978-987, Jul 2011.
- [57] D. M. Zhang and J. Chang, "Patterning of electrospun fibers using electroconductive templates," *Advanced Materials*, vol. 19, pp. 3664-+, Nov 2007.
- [58] Z. W. Ding, A. Salim, and B. Ziaie, "Selective Nanofiber Deposition through Field-Enhanced Electrospinning," *Langmuir*, vol. 25, pp. 9648-9652, Sep 2009.
- [59] Y. W. Liu, L. Zhang, H. N. Li, S. L. Yan, J. S. Yu, J. Weng, *et al.*, "Electrospun Fibrous Mats on Lithographically Micropatterned Collectors to Control Cellular Behaviors," *Langmuir*, vol. 28, pp. 17134-17142, Dec 2012.
- [60] Q. Cheng, B. L. P. Lee, K. Komvopoulos, and S. Li, "Engineering the Microstructure of Electrospun Fibrous Scaffolds by Microtopography," *Biomacromolecules*, vol. 14, pp. 1349-1360, May 2013.
- [61] M. Moffa, A. G. Sciancalepore, L. G. Passione, and D. Pisignano, "Combined Nano- and Micro-Scale Topographic Cues for Engineered Vascular Constructs by Electrospinning and Imprinted Micro-Patterns," *Small*, vol. 10, pp. 2439-2450, Jun 2014.
- [62] W. Song, D. An, D. I. Kao, Y. C. Lu, G. H. Da, S. B. Chen, *et al.*, "Nanofibrous Microposts and Microwells of Controlled Shapes and Their Hybridization with Hydrogels for Cell Encapsulation," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 6, pp. 7038-7044, May 2014.
- [63] P. F. Jao, E. W. Franca, S. P. Fang, B. C. Wheeler, and Y. K. Yoon, "Immersion Lithographic Patterning of Electrospun Nanofibers for Carbon Nanofibrous Microelectrode Arrays," *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 24, pp. 703-715, Jun 2015.
- [64] C. J. Luo, S. D. Stoyanov, E. Stride, E. Pelan, and M. Edirisinghe, "Electrospinning versus fibre

- production methods: from specifics to technological convergence," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, pp. 4708-4735, 2012.
- [65] A. L. Yarin and E. Zussman, "Upward needleless electrospinning of multiple nanofibers," *Polymer*, vol. 45, pp. 2977-2980, Apr 2004.
- [66] B. A. Lu, Y. J. Wang, Y. X. Liu, H. G. Duan, J. Y. Zhou, Z. X. Zhang, *et al.*, "Superhigh-Throughput Needleless Electrospinning Using a Rotary Cone as Spinneret," *Small*, vol. 6, pp. 1612-1616, Aug 2010.
- [67] X. Wang, H. T. Niu, T. Lin, and X. G. Wang, "Needleless Electrospinning of Nanofibers With a Conical Wire Coil," *Polymer Engineering and Science*, vol. 49, pp. 1582-1586, Aug 2009.
- [68] B. Ding, E. Kimura, T. Sato, S. Fujita, and S. Shiratori, "Fabrication of blend biodegradable nanofibrous nonwoven mats via multi-jet electrospinning," *Polymer*, vol. 45, pp. 1895-1902, Mar 2004.
- [69] T. C. Merkel, V. I. Bondar, K. Nagai, B. D. Freeman, and I. Pinnau, "Gas sorption, diffusion, and permeation in poly(dimethylsiloxane)," *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, vol. 38, pp. 415-434, Feb 2000.
- [70] A. G. Emslie, F. T. Bonner, and L. G. Peck, "Flow of a Viscous Liquid on a Rotating disk," *Journal of Applied Physics*, vol. 29, pp. 858-862, 1958.
- [71] D. Meyerhofer, "Characteristics of Resist Films Produced by Spinning," *Journal of Applied Physics*, vol. 49, pp. 3993-3997, 1978.
- [72] D. P. Birnie, "Rational solvent selection strategies to combat striation formation during spin coating of thin films," *Journal of Materials Research*, vol. 16, pp. 1145-1154, Apr 2001.
- [73] P. Ross, R. Mayer, and M. Benziman, "Cellulose biosynthesis and function in bacteria," *Microbiological Reviews*, vol. 55, pp. 35-58, 1991.
- [74] S. P. Lin, I. L. Calvar, J. M. Catchmark, J. R. Liu, A. Demirci, and K. C. Cheng, "Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose," *Cellulose*, vol. 20, pp. 2191-2219, Oct 2013.
- [75] K. E. Gridley, P. S. Green, and J. W. Simpkins, "Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid (25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells," *Brain Research*, vol. 778, pp. 158-165, Dec 1997.
- [76] A. W. Nienow, Q. A. Rafiq, K. Coopman, and C. J. Hewitt, "A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 85, pp. 79-88, Apr 2014.
- [77] Y. Park, Y. M. Chen, L. Ordovas, and C. M. Verfaillie, "Hepatic differentiation of human embryonic stem cells on microcarriers," *Journal of Biotechnology*, vol. 174, pp. 39-48, Mar 2014.
- [78] M. E. Rodrigues, A. R. Costa, P. Fernandes, M. Henriques, P. Cunnah, D. W. Melton, *et al.*, "Evaluation of Macroporous and Microporous Carriers for CHO-K1 Cell Growth and Monoclonal Antibody Production," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, pp. 1308-1321, Sep

- 2013.
- [79] S. Stich, Y. Ibold, A. Abbas, M. Ullah, M. Sittinger, J. Ringe, *et al.*, "Continuous Cultivation of Human Hamstring Tenocytes on Microcarriers in a Spinner Flask Bioreactor System," *Biotechnology Progress*, vol. 30, pp. 142-151, Jan 2014.
- [80] S. Ting, A. Chen, S. Reuveny, and S. Oh, "An intermittent rocking platform for integrated expansion and differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes in suspended microcarrier cultures," *Stem Cell Research*, vol. 13, pp. 202-213, Sep 2014.
- [81] Y. F. Yuan, M. S. Kallos, C. Hunter, and A. Sen, "Improved expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in microcarrier-based suspension culture," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 8, pp. 210-225, Mar 2014.
- [82] Z. P. Zhang, J. Hu, and P. X. Ma, "Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 1129-1141, Sep 2012.
- [83] C. Ma, Y. Jing, H. C. Sun, and X. H. Liu, "Hierarchical Nanofibrous Microspheres with Controlled Growth Factor Delivery for Bone Regeneration," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 4, pp. 2699-2708, Dec 2015.
- [84] Z. P. Zhang, M. J. Gupte, X. B. Jin, and P. X. Ma, "Injectable Peptide Decorated Functional Nanofibrous Hollow Microspheres to Direct Stem Cell Differentiation and Tissue Regeneration," *Advanced Functional Materials*, vol. 25, pp. 350-360, Jan 2015.
- [85] W. Wang, M. Dang, Z. P. Zhang, J. Hu, T. W. Eyster, L. X. Ni, *et al.*, "Dentin regeneration by stem cells of apical papilla on injectable nanofibrous microspheres and stimulated by controlled BMP-2 release," *Acta Biomaterialia*, vol. 36, pp. 63-72, May 2016.
- [86] R. Kuang, Z. P. Zhang, X. B. Jin, J. Hu, S. T. Shi, L. X. Ni, *et al.*, "Nanofibrous spongy microspheres for the delivery of hypoxia-primed human dental pulp stem cells to regenerate vascularized dental pulp," *Acta Biomaterialia*, vol. 33, pp. 225-234, Mar 2016.
- [87] X. W. Li, C. Ma, X. H. Xie, H. C. Sun, and X. H. Liu, "Pulp regeneration in a full-length human tooth root using a hierarchical nanofibrous microsphere system," *Acta Biomaterialia*, vol. 35, pp. 57-67, Apr 2016.
- [88] G. J. Feng, Z. P. Zhang, M. Dang, X. J. Zhang, Y. Doleyres, Y. M. Song, *et al.*, "Injectable nanofibrous spongy microspheres for NR4A1 plasmid DNA transfection to reverse fibrotic degeneration and support disc regeneration," *Biomaterials*, vol. 131, pp. 86-97, Jul 2017.
- [89] B. Duan, X. Zheng, Z. X. Xia, X. L. Fan, L. Guo, J. F. Liu, *et al.*, "Highly Biocompatible Nanofibrous Microspheres Self-Assembled from Chitin in NaOH/Urea Aqueous Solution as Cell Carriers," *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 54, pp. 5152-5156, Apr 2015.
- [90] X. H. Liu, X. B. Jin, and P. X. Ma, "Nanofibrous hollow microspheres self-assembled from star-shaped polymers as injectable cell carriers for knee repair," *Nature Materials*, vol. 10, pp. 398-406, May 2011.



- [91] Z. P. Zhang, R. L. Marson, Z. S. Ge, S. C. Glotzer, and P. X. Ma, "Simultaneous Nano- and Microscale Control of Nanofibrous Microspheres Self-Assembled from Star-Shaped Polymers," *Advanced Materials*, vol. 27, pp. 3947-+, Jul 2015.
- [92] A. R. Mackie, A. P. Gunning, M. J. Ridout, and V. J. Morris, "Gelation of gelatin observation in the bulk and at the air-water interface," *Biopolymers*, vol. 46, pp. 245-252, Oct 1998.
- [93] 義. 長田 and 莞. 梶原, *ゲルハンドブック, 普及版* ed.: エヌ・ティー・エス, 2003.
- [94] T. Cosgrove, *Colloid science : principles, methods and applications*, 2nd ed ed.: Wiley, 2010.
- [95] W. C. Griffin, "Classification of surface-active agents by" HLB"," *J. Soc. Cos. Chemists*, vol. 1, pp. 311-326, 1949.
- [96] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 3rd ed ed.: Academic Press, 2011.
- [97] K. N. Pearce and J. E. Kinsella, " Emulsifying Properties of Proteins - Evaluation of a Turbidimetric Technique," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 26, pp. 716-723, 1978.
- [98] P. A. Zhu and L. Q. Wang, "Passive and active droplet generation with microfluidics: a review," *Lab on a Chip*, vol. 17, pp. 34-75, Jan 2017.
- [99] P. B. Umbanhowar, V. Prasad, and D. A. Weitz, "Monodisperse emulsion generation via drop break off in a coflowing stream," *Langmuir*, vol. 16, pp. 347-351, Jan 2000.
- [100] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrod, P. SoonShiong, and G. SkjakBraek, "Alginate polycation microcapsules .1. Interaction between alginate and polycation," *Biomaterials*, vol. 17, pp. 1031-1040, May 1996.
- [101] S. Yoshida, M. Takinoue, and H. Onoe, "Compartmentalized Spherical Collagen Microparticles for Anisotropic Cell Culture Microenvironments," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 6, p. 7, Apr 2017.
- [102] K. Marshall, "Electrophoretic properties of fast-and slow-growing species of Rhizobium," *Australian journal of biological sciences*, vol. 20, pp. 429-438, 1967.
- [103] I. Moreno-Garrido and J. P. Canavate, "Assessing chemical compounds for controlling predator ciliates in outdoor mass cultures of the green algae *Dunaliella salina*," *Aquacultural Engineering*, vol. 24, pp. 107-114, Feb 2001.
- [104] C. Y. Xu, K. Y. Wu, S. W. Van Ginkel, T. Igou, H. J. Lee, A. Bhargava, *et al.*, "The Use of the Schizonticidal Agent Quinine Sulfate to Prevent Pond Crashes for Algal-Biofuel Production," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, pp. 27450-27456, Nov 2015.
- [105] S. W. Van Ginkel, M. Bidwell, T. Igou, R. Gijon-Felix, E. Salvi, S. H. R. De Oliveira, *et al.*, "The prevention of saltwater algal pond contamination using the electron transport chain disruptor, rotenone," *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, vol. 18, pp. 209-212, Sep 2016.
- [106] E. P. Lincoln, T. W. Hall, and B. Koopman, " Zooplankton Control in Mass Algal Cultures," *Aquaculture*, vol. 32, pp. 331-337, 1983.

- [107] L. Brennan and P. Owende, "Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products," *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, pp. 557-577, Feb 2010.
- [108] M. E. Huntley and D. G. Redalje, "CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal," *Mitigation and adaptation strategies for global change*, vol. 12, pp. 573-608, 2007.
- [109] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, pp. 217-232, Jan 2010.
- [110] S. Nakajima, R. Kawano, and H. Onoe, "Stimuli-responsive hydrogel microfibers with controlled anisotropic shrinkage and cross-sectional geometries," *Soft Matter*, vol. 13, pp. 3710-3719, May 2017.
- [111] W. Zhang, X. Liu, J. Wang, J. Tang, J. Hu, T. Lu, *et al.*, "Fatigue of Double-Network Hydrogels," *Engineering Fracture Mechanics*, 2017.
- [112] J. Y. Sun, X. H. Zhao, W. R. K. Illeperuma, O. Chaudhuri, K. H. Oh, D. J. Mooney, *et al.*, "Highly stretchable and tough hydrogels," *Nature*, vol. 489, pp. 133-136, Sep 2012.
- [113] M. Hu, R. S. Deng, K. M. Schumacher, M. Kurisawa, H. Y. Ye, K. Purnamawati, *et al.*, "Hydrodynamic spinning of hydrogel fibers," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 863-869, Feb 2010.
- [114] D. Di Carlo, N. Aghdam, and L. P. Lee, "Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays," *Analytical Chemistry*, vol. 78, pp. 4925-4930, Jul 2006.
- [115] A. M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch, and J. Voldman, "Microfluidic control of cell pairing and fusion," *Nature Methods*, vol. 6, pp. 147-152, Feb 2009.
- [116] W. H. Tan and S. Takeuchi, "A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, pp. 1146-1151, Jan 2007.