

博 士 (理 学) アナンド プトラ

学 位 論 文 題 名

Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose Gel with Oriented Fibril Alignment on Silicone-Based Template

(シリコンベースの鋳型を用いた
配向バクテリアセルロースゲルの合成とその評価)

学位論文内容の要旨

This dissertation consists of 5 chapters described mainly on the development and the formation of bacterial cellulose gel with oriented fibril alignment by using several types of template/molds in static cultivation.

Bacterial cellulose (BC) is a form of cellulose with unoriented microfibril network structure produced by bacteria such as *Acetobacter xylinum* (*A. xylinum*). Though identical in chemical composition, structure and mechanical properties such as high tensile strength and modulus, high water holding capacity, high moldability, high crystallinity and high biocompatibility of the BC differs from those of plant cellulose. Since it has been discovered by Brown in 1886, great development of BC has been obtained. Various techniques to produce BC in large scale beside traditional static cultivation have been invented such as internal loop air lift reactor, stirred fermentor, and the rotating biological contactor (RBC). Furthermore, factors affecting growth of BC also have been intensively investigated by researchers to obtain excellent properties BC which can be applied in many fields. So far, BC has been widely used in foods, in acoustic diaphragms for audio speakers and headphone, and for making unusually strong paper. Currently, BC also has received much attention in medical, pharmaceutical and prosthetic applications such as wound dressings, artificial skin, artificial blood vessel, special membrane, culture substrate for mammalian cells, and scaffold for tissue engineering of cartilages.

Being concerned on its structure, production of the BC gel with well-oriented fibril alignment could give benefit as substitute materials in medical and pharmaceutical applications. It is already well known that formation of highly oriented structure can improve the performance of materials. For example, oriented structure improves the stiffness and strength of crystalline polymers compared with un-oriented materials. To date, limited attempts have been carried out to make an oriented BC fibrils during cultivation of bacterium *Acetobacter* by adding chemicals, such as lipid and polysaccharides, or by using a surface with oriented polysaccharides chains. Results of these attempts are found only localized fibril orientation in BC. Moreover, it is still

unclear to explain the orientation process of the BC fibril. Therefore, there is a need to construct a new method to create a BC with well-oriented fibril.

In our investigation, BC gel with oriented fibril has been produced by using a novel one-pot method on polydimethylsiloxane (PDMS) substrate. *A. xylinum*, ATCC 53582 was used as cellulose producer, and Hestrin and Schramm medium was used as culture medium to obtain BC gel. In this work, we discovered that BC gel produced on an oxygen permeable substrate of PDMS shows strong birefringence with colorful images, indicating a liquid crystal-like structure. Furthermore, we found that uni-axially oriented BC gels can be obtained by culturing the BC on the PDMS with ridged morphology. The degree of orientation of BC gels, as revealed by the birefringence, increased with the decrease in the ridge size of the PDMS substrate, and reached a maximum at a ridge size of 4.5 μ m, about the contour length of the bacteria cells, where BC gels showed the highest birefringence (Δn), the highest fracture stress (σ), highest swelling degree (q), the lowest elastic modulus (E), and the thickest BC fibril. The fracture strength σ of the uni-axially oriented BC gel under elongation was 4.6 MPa, which was 2.3 times higher than that of BC-air (σ = 2 MPa).

Another investigation related to the orientation of BC fibril has been done on a curvature surface. In this work, we used a simple technique by using tube type mold such as silicone tube to synthesize tube-shape BC gel with oriented fibril alignment. We found that a desired in length, inner diameter and thickness of BC-tube gel with uni-axially oriented fibril alignment can be obtained by culturing the BC in oxygen permeable silicone tube with inner diameter less than 8 mm. The orientation direction of the BC fibrils followed the lengthwise of the silicone tube direction that did not depend on the gravity and oxygen availability, morphology of inner surface of silicone tube, but depends on the curvature of silicone tube. The degree of orientation, Δn , of BC-tube gels, as revealed by the birefringence, increased with the decrease in inner diameter of silicone tube. The BC-tube type with uni-axially oriented fibril structure has excellent mechanical properties and is a promising material that can be used as micro-vessel or a soft tissue material in medical and pharmaceutical applications.

All above the method shows that well oriented fibril of BC are created on a ridges-polydimethylsiloxane and also in a silicone tube. It is concluded that by covering surface of culture medium with oxygen permeable materials (which mean the culture medium) will not directly contact with air could induce the fibril orientation of BC. We hope this invention will provide a new insight not only into the method to create oriented fibril but also into the creation and the development of biomaterials which can be used in wide range application such as medical or pharmaceutical field.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 龔 劍 萍
副 査 教 授 佐々木 直 樹
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 准教授 古 川 英 光

学 位 論 文 題 名

Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose Gel with Oriented Fibril Alignment on Silicone-Based Template

(シリコンベースの鋳型を用いた
配向バクテリアセルロースゲルの合成とその評価)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

本学位論文は5章から構成され、シリコンベースの鋳型を用いた配向バクテリアセルロースゲル(BC) 合成法の確立、及び得られた配向BCゲルの力学物性評価について主に述べられている。

BC は酢酸菌により生産されるゲル状のセルロース膜のことで一般にはナタデココとして知られる。優れた物理的性質や高い生体適合性を有していることから様々な分野への応用が期待されている。その乾燥シートは合板補強材やスピーカーの振動板など工業材料へ、またゲル膜は火傷治療や人工血管などの医療材料に利用されている。この酢酸菌の作るBCにはもう一つのユニークな特徴がある。階層構造を有する点である。酢酸菌ターミナルコンプレックスから吐き出されるセルロースはミクロフィブリル→フィブリルを経て繊維となりさらにその繊維が絡まりあって三次元網目構造を形成している。しかし、これまでの研究から層内には秩序構造はなく等方的なBCネットワークを形成していることがわかっている。一方で、植物の細胞壁の内側には二次壁とよばれるセルロースからなる多層膜が存在する。そのセルロース繊維は各層で同一方向に極めて秩序正しく配向している。この配向構造が植物の非常に優れた力学物性に関与していると考えられる。BCゲルの層内に配向構造を導入できれば更なる力学物性の向上が期待される。これまで、BC合成時に脂質膜や糖鎖などを添加することで配向BCゲルが得られることがわかっている。しかし、その配向度はきわめて低い。その他のにも配向糖鎖表面上でバクテリアを培養する事で配向BCゲルが得られることがわか

っている。しかし手順が非常に複雑で簡便な方法とは言い難い。

著者は、酸素透過性に優れるシロキサン含有エラストマー（ポリジメチルシロキサン：PDMS）を用いることで配向バクテリアセルロース・ワンポット合成法を開発した。表面に微細加工技術を用いて数 μm から数十 μm 間隔でストライプ状のエッジを施し、その基板で作成したセル内で酢酸菌の固/液培養を行うことでその配向 BC が得られる。気/液培養で合成した BC ゲルの表面は白濁し光沢がないのに対し PDMS を用いた固/液培養で合成した BC ゲルは金属様の光沢を呈する。さらに偏光顕微鏡を用いて観察すると気/液培養で合成した BC ゲルは非常に弱い複屈折性を示すのに対し PDMS を用いた固/液培養で合成した BC ゲルは等方的な強い複屈折性を示す。BC の複屈折率はエッジサイズが減少するとともに上昇し同時に 45 度おきに明暗が現れるようになる。最も高い複屈折率(Δn)は酢酸菌 (1~4 μm) と同サイズのエッジを施した表面で培養合成される BC に観測され、その値は $\Delta n=0.01$ となる。またその条件では BC ゲルが偏向方向と平行あるいは直行する場合に完全に消光し 45 度で輝度が最大となる。異方的な配向の様子は走査型顕微鏡によっても確認され、分岐の少ない太さ約 180nm の BC ファイバーがエッジの刻まれた方向に沿って配列している。このような形態は植物細胞二次壁の構造と非常に類似している。固/液培養でみられる配向 BC ゲルの形成メカニズムは酢酸菌のセル中での移動度と関連していると考えられる。桿菌である酢酸菌は硬い棒状の分子としてみなすことができる。このような棒状分子は表面方向には移動しやすいが、倒方方向の移動は大きく制限される。セル内に閉じ込められた酢酸菌は BC ファイバーの合成のため PDMS を透過して供給される限られた酸素を求めその最表面に局在化する。基盤と相互作用することで側方方向の運動性の妨げられた酢酸菌が配向 BC ゲルを生産すると考えられる。BC ゲルの易動度と配向性については第三章にまとめられている。

著者は、さらに配向性の付与が BC ゲルの力学物性にも影響を与えることを明らかにしている。引っ張り試験で検出される気/液培養 BC ゲルの破断応力は約 2MPa 程度であるが、この値は BC ゲルの複屈折率の増加とともに上昇し、最も高い複屈折率を与える点で約 5MPa に達する。約 2.5 倍近く引っ張り強度が向上する。またこのときの含水率は 99% 以上でありゲル材料としても優れるものである。このような知見を生かし第四章では、中空状のシリコーン基盤を用いたチューブ状の配向 BC ゲルの合成について述べられている。これらの結果は新規医療材料の創製などへの応用にも多大な貢献を与えるのみならず、生物物質の配向機構の解明にも重要な知見を与えるものである。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。