

Preparation of Bacterial Cellulose Membranes Impregnated with Ionic Liquids

Michiaki MATSUMOTO*, Daisuke KAWABATA* and Kazuo KONDO*

(Received March 26, 2014)

Cellulose, the main component of plant cell walls, is the most abundant biopolymer on earth and one of the most exploited natural resources. It is also produced by bacteria. Bacterial cellulose (BC) is generated by *Gluconacetobacte xylinum* as a three-dimensional network of nano- and microfibrils of cellulose with 10–100 nm diameters, which possesses unique physical and mechanical properties. So in comparison with cellulose from plants, BC has a higher mechanical strength, porous property, purity and absorbency. In this study, cultured BC was used as a supported material of supported ionic liquid membranes (SILM) which have been proposed as effective methods for the selective separation between different chemical species in dilute streams. BC membranes were generated sufficiently at 2.0 to 2.5 g/dl glucose concentration in culture media. From the electron microscopic pictures, BC membranes were found to be successfully impregnated with the hydrophobic ionic liquid, Aliquat 336 (*N*-methyl-*N,N*-dioctyloctan-1-octanaminium chloride) and the hydrophilic ionic liquid, [C₄mim][Cl] (1-butyl-3-methylimidazolium chloride). Finally, lactic acid permeation was examined with these supported ionic liquid membranes.

Key words : bacterial cellulose, ionic liquid, liquid membrane

キーワード : バクテリアセルロース, イオン液体, 液膜

イオン液体含浸バクテリアセルロース膜の調製

松本道明, 河島大祐, 近藤和生

1. 緒言

植物細胞壁の主な成分であるセルロースは地球上で最も豊富な天然高分子物質であり, 多方面で利用されている有用な生物資源である. また植物とは別に, セルロースはバクテリア, 藻および菌類からも合成される¹⁾. 酢酸菌から生成されるバクテリアセルロース(以下 BC と略す)は, セルロース部の分子構造は植物セルロースと完全に一致している. しかし植物由来のセルロースは, 多くの場合リ

グニンやヘミセルロースなどの他の天然高分子と結合しているが, BC はバクテリアによって高純度な形で生成される細胞外多糖である. BC は超微細ナノ繊維の網目構造や高い機械的強度, 高い多孔性, 高い純度, 高吸収性などの特異的性質を持つため, 人工皮膚および透明フィルム, 分離膜などの利用が期待されている²⁾. これまで, BC の分離膜への応用については, リチウム電池におけるセパレータ膜やガス分離, 透析膜の研究が多くを占めている. ま

*Department of Chemical Engineering and Materials Science, Doshisha University, Kyoto
Telephone/FAX: +81-774-65-6655, E-mail: mmatsumo@mail.doshisha.ac.jp

た最近, 多くの溶媒に不溶であるセルロースがイオン液体 1-butyl-3-methyl imidazolium chloride ([C₄mim][Cl])に溶解することが見出され³⁾, イオン液体中の溶解したセルロースの酵素的糖化反応が活発に研究されている⁴⁾.

これまで著者らは, イオン液体(IL)を合成高分子膜に含浸した液膜分離操作について検討してきた^{5,6)}. イオン液体含浸液膜はこれまでの有機溶媒含浸液膜に比べかなり安定ではあるものの, まだ十分ではない⁷⁾. そこで本研究では, イオン液体との相互作用が期待でき, 高度に発達した網目構造をもつバクテリアセルロースのイオン液体支持担体としての可能性を検討した.

2. 実験

2.1 バクテリアセルロース生成菌の培養

バクテリアセルロース生成のために用いた菌は *Gluconacetobacter xylinum* ATCC 23767 である. Table 1 に示した組成を持つグルコースを炭素源とする液体培地を滅菌処理後, クリーンベンチ内でその 90 ml を深底シャーレに入れた. そこへ前培養液 10 ml を加え, 25°C の恒温室(KCI-2000, 東京理化)で 10 日間静置培養した. 培養中の濁度およびグルコース濃度の経時変化は次のような方法で測定した.

培養している液体培地をクリーンベンチ内で 1 日ごとに 1 ml 採取し, これを 10 倍希釈した後にその濁度を紫外可視分光光度計(UV-2500PC, 島津製作所)により, 波長 660 nm で測定した. また, 同様に採取した溶液をシリンジフィルターでろ過後, 試料液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定することでグルコース濃度を測定した. HPLC の条件は Table 2 に示した.

2.2 バクテリアセルロース膜の調製

10 日間培養後, 培養液上に生成した BC を採取し, 4%(w/v)のドデシル硫酸ナトリウム水溶液中 70°C で 3 時間放置した. その後 BC を取り出し, 4%(w/v)水酸化ナトリウム水溶液中で, さらに 70°C で 1 時間放置した. 得られた BC を蒸留水で pH が 7 付近になるまで洗浄し, その後膜を凍結乾燥して BC 膜

を得, その重量を測定した.

2.3 バクテリアセルロース膜へのイオン液体の含浸

シャーレにイオン液体 Aliquat 336 (N-methyl-N,N-dioctyl-octan-1-octanaminium chloride)もしくは [C₄mim][Cl]を入れ, そこに凍結乾燥させた BC 膜を入れて 24 時間放置した. その後, シャーレから BC 膜を取り出し, 表面の余分なイオン液体をクロスで除去した. 得られた膜を 24 時間真空乾燥することでイオン液体含浸 BC 膜を得た. 作成した膜の膜厚をマイクロメータ (MDC 25M, Mitutoyo) を用いて測定した. また含浸後の膜重量を測定し, 膜表面を予め導電性の物質である白金パラジウムでコーティングすることで SEM により表面状態を観察した.

Table 1. Composition of broth medium with glucose in 100 mL distilled water.

Glucose	2.0 g
Peptone	0.5 g
Yeast extract	0.5 g
Disodium phosphate	0.27 g
Citric acid	0.115 g

Table 2. HPLC conditions.

Column	Shodex SH1011
Guard column	Shodex SH-G
Pump	SHIMADZU LC-10AD
Detector	SHIMADZU RID 6A
Eluent	5 mM H ₂ SO ₄
Flow rate	1.0 ml/min
Column temperature	40°C
Injection volume	20 μL

2.4 イオン液体含浸膜による乳酸透過

乳酸水溶液は市販の乳酸を加熱還流することによりモノマー化処理を行ったものを用いて 0.01 mol/L に調製し, その pH は濃水酸化ナトリウム溶液で 5.5 に調整した. Fig. 1 に示す装置の供給相に

乳酸水溶液, 受容相に 0.1 mol/L 塩酸水溶液をそれぞれ 110 ml ずつ入れた. 両相の間に IL 含浸 BC 膜を挟み込み, マグネティックスターラーを用いて 300 rpm で攪拌した. 2 時間ごとに供給相と受容相の pH を測定し, さらに両相から 0.5 ml ずつ溶液を採取し, それぞれの溶液の乳酸濃度を Table 2 の条件で HPLC を用いて測定した.

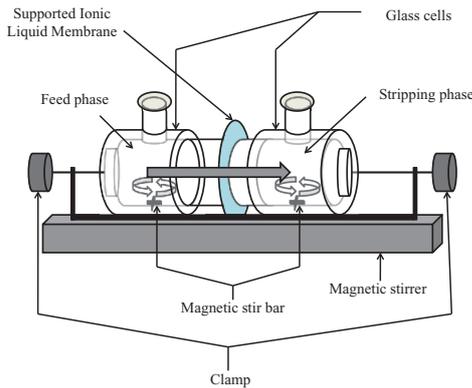


Fig. 1. Experimental apparatus for lactic acid permeation.

3. 結果および考察

3.1 バクテリアセルロース生成菌の培養

本培養における液体培地の仕込みグルコース濃度と菌体濁度との関係を Fig. 2 に示した. 液体培地中のグルコース濃度が 1.0 g/dl までは菌体濁度が徐々に増加しており, 菌体が増殖している. しかし, グルコース濃度 1.0 g/dl 以上ではグルコース濃度の増加とともに濁度は低下し, 2.0 g/dl 以上では濁度は急激に減少した. これは, グルコース濃度 2.0 g/dl 以上で分離膜に適した BC 膜が得られたこととよく対応している. 一般的な菌体では菌体増殖と共に濁度は増加する傾向にあるが, BC を排出する酢酸菌においては排出した BC 内に菌体が存在しており, 液体培地中に菌体が拡散しにくくなるため⁸⁾, BC 生成量が多くなるほど液体培地中の菌体濁度は低くなると考えられる.

次に液体培地の仕込みグルコース濃度と菌体によるグルコース消費量との関係を Fig. 3 に示した. Fig. 3 から液体培地中のグルコース濃度の増加に伴って菌体のグルコース消費は 2.5 g/dl までは増加す

る傾向にあり, これ以降急激に減少した. 一般には菌体の主要な栄養分であるグルコース濃度を増加させるほど菌体はより活性が高くなり, グルコース消費量は大きくなる⁹⁾. BC 膜の生成は菌体のグルコース消費量の 2.0 g/dl からの急激な増加に対応しており, 菌体のグルコース消費は菌体増殖よりも, 主に BC 生成において多く消費されることを示している. しかし, 液体培地中のグルコース濃度が 2.5 g/dl 以上では菌体の栄養要求が低下し, すなわちグルコースの過剰摂取により BC 生成が抑制され, 菌体増殖が優先的に生じたと考えられる. よって以後の実験において本培養におけるグルコース濃度は 2.5 g/dl に決定した.

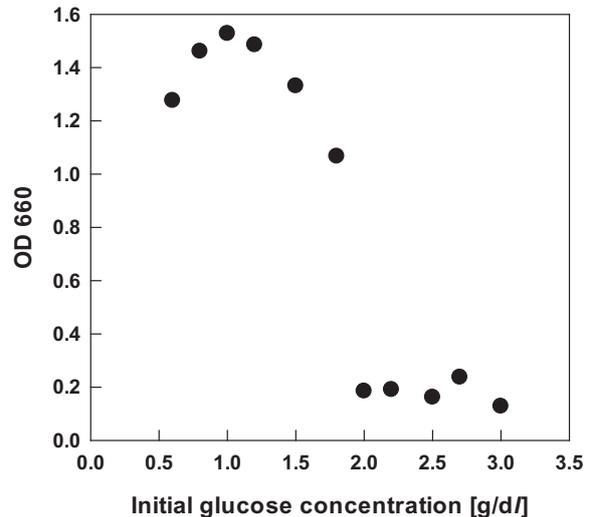


Fig. 2. Relationship between optical density and initial glucose concentration.

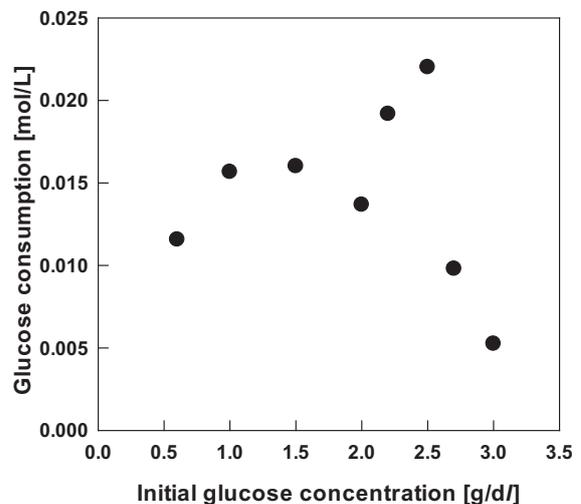


Fig. 3. Relationship between glucose consumption and initial glucose concentration.

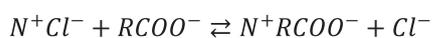
3.2 バクテリアセルロース膜へのイオン液体の含浸

SEM を用いて凍結乾燥後の BC 膜および IL 含浸 BC 膜のそれぞれの膜表面を観察した結果を Fig. 4 に示した. IL 含浸前の BC 膜表面 (Fig. 4(a)) と IL を加えた含浸膜 (Fig. 4(b)および(c)) を比較すると, 2 種類の IL どちらも BC 膜に含浸されていることがわかる. しかし, Aliquat 336 に比べて[C₄mim][Cl] を含浸させた場合, BC 膜の細孔はほとんど IL で占められていることがわかる. この結果から, Aliquat 336 よりも[C₄mim][Cl]は BC と強い相互作用を示し, より多く BC 膜内に保持されている. すなわち, IL の種類によって BC 膜への含浸量は異なり, 含浸量は IL との相互作用に大きく依存していると考えられる.

3.3 イオン液体含浸膜による乳酸透過

これまで著者らは合成高分子膜に支持されたイオン液体含浸膜による乳酸透過を研究してきたため^{5,6)}, ここで調製したイオン液体含浸 BC 膜の性能評価のためのモデル系として乳酸透過系を取り上げることにした.

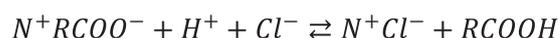
一般に発酵生産される乳酸水溶液の pH は 5~6 であることから, pKa = 3.86 の乳酸は発酵液中でアニオン解離した状態で存在する. このとき乳酸の透過は Fig. 5 のようなイオン交換機構で進行すると考えられている⁶⁾. すなわち供給相界面では



なるイオン交換反応の正反応が生じている. ここで

N^+Cl^- はイオン液体, $RCOO^-$ は乳酸イオンをそれぞれ示している.

乳酸イオンはイオン液体とのイオン交換により膜内に分配し, 濃度勾配に従う拡散により受容相界面に到達する. ここで塩酸水溶液と接触することで次式に従って, 受容相に未解離乳酸が放出される.



この機構に従って著者らは, 乳酸の上り坂輸送を観察してきた^{5,6)}.

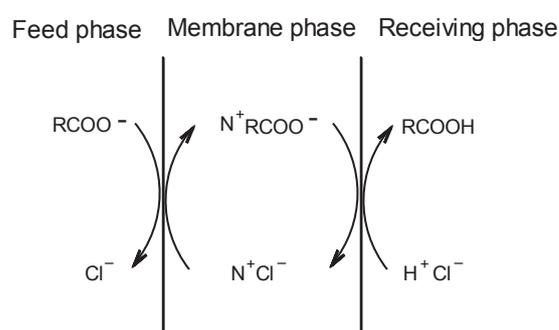


Fig. 5. Transport mechanism of lactic acid through liquid membrane.

供給相および受容相の乳酸濃度と pH の経時変化を Aliquat 336 および[C₄mim][Cl]を含浸させた BC 膜について Fig. 6 および 7 に示した. いずれの場合においても乳酸の透過が確認された. また, BC 膜の SEM 観察の結果からわかるように, Aliquat 336 に比べて[C₄mim][Cl]を含浸させた場合, BC 膜の細孔はほとんど IL で占められているため, [C₄mim][Cl]含浸 BC 膜の乳酸透過速度は小さかった.

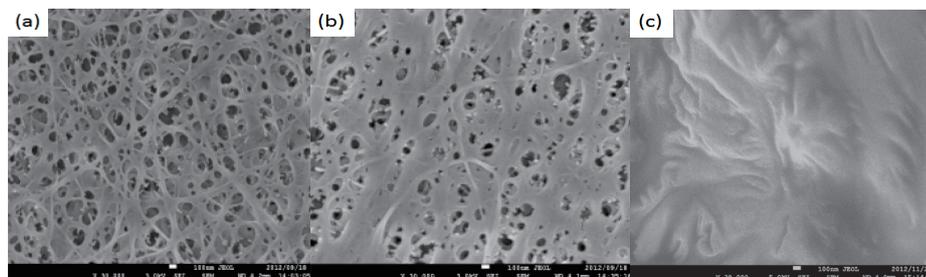


Fig. 4. SEM images of BC membranes.

- (a): Before impregnation
- (b): After impregnation of Aliquat 336
- (c): After impregnation of [C₄mim][Cl]

しかし、いずれの場合も乳酸の上り坂輸送は観測されなかった。また、2つのILを用いた透過実験は共に、透過開始5時間以内に供給相のpHが急激に減少している。これは受容相の水素イオンが素早く膜を通過して供給相側に移動したためであると考えられる。そのため、上で述べた乳酸のILによるイオン交換が行われず、乳酸の透過が行われにくい状態になったと考えられる。この結果からIL含浸BC膜を用いた乳酸の分離ではイオン交換はほとんど生じておらず、ILはイオン交換剤としてではなく物理的な溶媒として機能していることが示唆された。この場合、透過率は50%以下であることから、乳酸の受動拡散のみが生じていると考えられる。したがって、BC膜にイオン液体を含浸させることができたが、水素イオンの透過を制御できなかったため乳酸に対するイオン交換能は示さなかった。この点は今後の検討課題である。

4. 結言

本研究では酢酸菌である *Gluconacetobacter xylinum* ATCC23767 からBC膜を生成し、得られた膜のイオン液体の液膜支持担体としての可否について、モデル透過物質として乳酸を用いて、その透過特性により検討した。

まず液体培地中の最適グルコース濃度を決定するための検討を行った。液体培地中のグルコース濃度が増加に伴い菌体のグルコース消費量は徐々に増加し、グルコース濃度2.0 g/dlから急激に増加した。グルコース消費量および菌体濁度の結果を比較することで2.0 g/dlからBC生成が始まっていることがわかった。しかし、2.5 g/dl以上では菌体のグルコース消費が大幅に減少し、BC生成が阻害された。以上の結果から本培養における液体培地中の最適グルコース濃度は2.5 g/dlであった。

このように調製したBC膜への疎水性イオン液体Aliquat 336および親水性イオン液体[C₄mim][Cl]の担持が確認された。このイオン液体含浸BC膜を用いた乳酸透過実験において、乳酸の透過が確認され

たが、以前の合成高分子膜を支持担体として用いた場合に観測された上り坂輸送は観測されなかった。

以上の結果は、容易に生成可能である再生可能資源であり環境負荷の少ないBC膜のILを用いた液膜支持担体としての応用の可能性を示した。

本研究の一部は、同志社大学理工学研究所研究助成金および日本学術振興会科学研究費助成事業(基盤研究(C) 25420813)の助成を受けて行われた。記して謝意を表す。

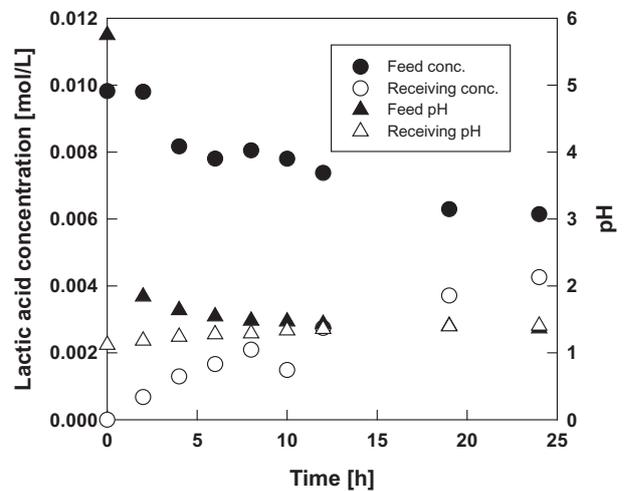


Fig. 6. Time courses of lactic acid concentration and pH with Aliquat 336 membrane.

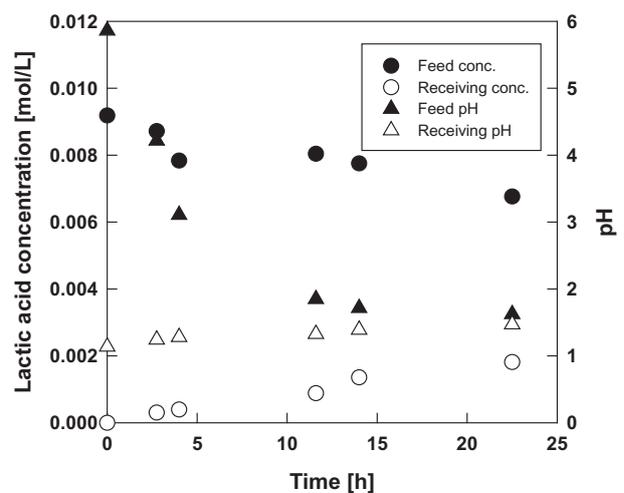


Fig. 7. Time courses of lactic acid concentration and pH with [C₄mim][Cl] membrane.

参考文献

- 1) D. Klemm, B. Heublein, H-P. Fink, A. Bohn, “Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 3358-3393 (2005).
- 2) L. C. Tome, L. Brandão, A. M. Mendes, A. J. D. Silvestre, C. P. Neto, A. Gandini, C. S. R. Freire, I. M. Marrucho, “Preparation and Characterization of Bacterial Cellulose Membranes with Tailored Surface and Barrier Properties”, *Cellulose*, **17**, 1203-1211 (2010).
- 3) R. P. Swatloski, S. K. Spear, J. D. Holbrey, R. D. Rogers, “Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids”, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4974-4975 (2002).
- 4) 神谷典穂, “イオン液体処理によるセルロース系バイオマスの酵素糖化”, *化学と生物*, **49**, 40-47 (2011).
- 5) M. Matsumoto, W. Hasegawa, K. Kondo, T. Shimamura, M. Tsuji, “Application of Supported Ionic Liquid Membranes Using a Flat Sheet and Hollow Fibers to Lactic Acid Recovery”, *Desal. Water Treat.*, **14**, 37-46 (2010).
- 6) M. Matsumoto, A. Panigrahi, Y. Murakami, K. Kondo, “Effect of Ammonium- and Phosphonium-based Ionic Liquids on the Separation of Lactic Acid by Supported Ionic Liquid Membranes (SILMs)”, *Membranes*, **1**, 98-108 (2011).
- 7) M. Matsumoto, Y. Murakami, Y. Minamidate, K. Kondo, “Separation of Lactic Acid through Polymer Inclusion Membranes Containing Ionic Liquids”, *Sep. Sci. Technol.*, **47**, 354-359 (2012).
- 8) A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jeziarska, M. Gonçalves-Mi[kiewicz, M. Turkiewicz, S. Bielecki, “Factors Affecting the Yield and Properties of Bacterial Cellulose”, *J. Ind. Microb. Biotechnol.*, **29**, 189-195 (2002).
- 9) F. Yoshinaga, N. Tonouchi, K. Watanabe, “Research Progress in Production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Its Application as a New Industrial Material”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 219-224 (1997).