酵母をテンプレートとして利用したジルコニア中空粒子の作製

Fabrication of Zirconia Hollow Spheres on Yeast Cell Templates

砥綿 篤哉, シバクマール マニカム, 安井 久一, 辻内 亨, 飯田 康夫

Atsuya Towata, Manickam Sivakumar, Kyuichi Yasui, Toru Tuziuti, Yasuo Iida

Received 18 February 2005 ; Accepted 11 July 2005

Zirconia hollow spheres were prepared using yeast cells as templates. Zirconium butoxide (ZNB) was used as a precursor and treated with triethanolamine (TEA) in order to obtain a basic aqueous zirconium hydroxide solution. Thus obtained basic zirconium hydroxide solution was then nucleated heterogeneously using yeast cells as templates. The results of this investigation show that the formed zirconia hollow spheres either keep the shape of the yeast cells or otherwise have a wrinkled shell. The shell of hollow spheres heated at 973K for 3 hours was from 0.1 to 0.25 μm in thickness and consisted of the nano crystals.

Keywords : Yeast, Coating, Hollow sphere, Zirconia, Bio-template

1. 緒 言

酸化物中空粒子は、材料の軽量化、断熱用途及び光散乱による隠蔽性向上などのために利用されている。その製造方法は、気相法ではスプレードライなどを用いて、物質が揮発することにより内部に空間ができることを利用したプロセスが知られている^{1,2)}。一方、液相法ではポリスチレンラテックス粒子のような高分子の粒子を用いた被覆型の複合粒子を用いる例が多数報告されている³⁾。しかしながら、ラテックス粒子は水への分散性が悪く、コーティングする物質を粒子表面へ被覆する足がかりとして、予めラテックス粒子にシラノール基を導入するなどの表面改質が必要であることが指摘されている⁴⁾。

一方、いわゆるテンプレートを用いたナノ構造体作製に関する研究の進展も著しく、MCM-41を代表例とするミセルをテンプレートとしたナノポーラス材料

をはじめ⁵⁾、エマルジョンをテンプレートとしたフォトリソニック結晶の作製等が試みられている⁶⁾。さらに、最近ではバイオテンプレートとしてDNAの構造をシリカゲルに写し取り、DNAの遺伝情報を半永久的に保存する技術や⁷⁾、バクテリア⁸⁾や染色体⁹⁾などをテンプレートとしたナノ構造体の作製例が報告されている。

われわれは、このようなバイオテンプレート技術の一つとして、酵母による中空粒子の作製に着目した。酵母は古くからパン製造における発酵過程で利用されるなど、工業的に大規模に利用されており、入手が容易で、しかも安価である。大きさとしても数ミクロン程度と中空粒子としての利用に適当なものである。酵母は、生きている状態で水分70%を含み、アルコキシドの加水分解に必要な水分を内包したマイクロカプセルと考えることも可能である。また、その構造は主として β -グルカンや α -マンナンなどの糖類から構成された細胞壁を持ち¹⁰⁾、他の微生物、例えば大腸菌や乳酸菌などと比べて堅牢でありテンプレートとして扱いやすい。さらに、その表面は親水性であり、ポリスチレンラテックスのような付加的な親水化処理を必要としない。

本研究では、このようにテンプレートとして優れた特性が期待される酵母を用い、ジルコニア中空粒子の

産業技術総合研究所先進製造プロセス研究部門

(〒463-8560 名古屋市守山区下志段味穴ヶ洞2266-98)

TEL 052-736-7517

Ultrasonic Processing Group, Advanced Manufacturing

Research Institute, National Institute of Advanced

Industrial Science and Technology (AIST)

(2266-98 Anagahora, Shimo-Shidami, Moriyama-ku,

Nagoya 463-8560, Japan)

作製を行った。その結果、酵母表面における不均一核生成により加水分解生成物を膜状に析出させることが可能であり、熱処理条件を制御することにより、酵母の形状を保ったままの粒子や、収縮したひだ状の表面を持つ中空粒子を得ることができることを見出したので、以下に報告する。

2. 実 験

酵母には、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, オリエンタル酵母工業 (株) 製) を生イーストとして入手し、数回、蒸留水で攪拌洗浄した後にテンプレートとして使用した。ジルコニアの原料としては、85% ジルコニウム (IV) ブトキシド 1-ブタノール溶液 (和光純薬工業 (株) 製) を用いた。また、ジルコニウム溶液の安定化剤として、トリエタノールアミン (TEA と略称) (ハヤシ化成 (株) 製) を用いた。

中空粒子の作製手順は次のように行った。まず、85% ジルコニウム (IV) ブトキシド 1-ブタノール溶液 [ジルコニウム (IV) ブトキシド (ZNB と略称) 0.02mol] と TEA を所定の割合で混合し、12時間室温で攪拌する。その後、水を 50ml 加え攪拌を続ける。一方、酵母 5g を水 150ml に加え分散させる。これら二つの溶液を混合し、60時間攪拌することにより酵母表面にアルコキシド加水分解物を析出させ、コーティング処理酵母を得る。コーティング処理酵母はエタノール及び水で洗浄して室温で乾燥する。さらに、昇温速度毎分 10K、773K から 1273K の所定温度、保持時間 3 時間、大気中で熱処理を行うことにより、ジルコニアの結晶化を進めるとともに有機物を熱分解し中空粒子化する。

得られたジルコニア中空粒子は、SEM (JM-5600N: 日本電子 (株) 製)、及び X 線回折 (Model RINT-2550/PC: リガク (株) 製) を用いて評価した。また、熱測定は DTA/TG (Model 2020S MK12: マックサイエンス (株) 製) を用い、試料量 5mg、昇温速度毎分 10K、静止空気中という条件において行った。

3. 結果と考察

3.1 コーティング処理条件の検討

ZNB は以下のような急速な加水分解反応をすることが知られている。

マクロポアーのない均一な膜を形成するために、TEA を用いて、ZNB の急速な加水分解による沈殿形

Fig. 1 SEM photograph of yeast cells

成を抑制した。TEA はエタノールアミノ基をもち、 β 位に電気陰性な窒素原子を持つアルコールである。この窒素原子のために、OH 基は通常のアルコールに比べ高い酸性度をもち、アルコキシドと容易にアルコール交換し、アミノアルコールが生成する。また、アルコール交換が起これば、 β 位の窒素原子金属に配位し、いわゆるキレート環が形成され、そのアルコキシドはさらに安定になると言われている¹³⁾。

TEA/ZNB 比 (モル比として表す) を検討したところ、TEA/ZNB 比が 0.4 の場合には、混合溶液に水を加えると、すぐに沈殿が生成しコーティングには不適當であった。また、TEA/ZNB 比を 0.6 とすると薄く白濁した状態となって沈殿物はあまり見られず、0.8 以上の場合には透明で安定な溶液を得ることが可能であった。しかしながら、TEA/ZNB 比を大きくしすぎても、過度に安定な溶液となってしまう、加水分解は進まず、コーティングは困難であった。これらの結果から、TEA/ZNB 比は 0.6 から 1 の範囲で以降の実験を行った。

酵母の SEM 写真を Fig. 1 に示す。酵母の粒径は 2 から 4 μm であり、単分散粒子という表現は当たらないものの、かなり均一な粒径分布を持つものであることが確認できる。表面のざらつきは少なく滑らかであった。中央の酵母に認められる 0.5 μm 程度の突起は出芽痕である。Fig. 2 (a) に、TEA/ZNB 比を 1 としコーティング処理した酵母の SEM 写真を示す。コーティングを行った酵母の粒径は 2 から 4 μm であり、酵母の外形を維持した楕円形をしており、特徴的な出芽痕も確認でき、良好なコーティングがなされていることを示している。写真右下に認められる 1 μm 以下の粒子は、ジルコニア凝集物による粒子と考えられるが、その存在量は少なかった。さらに、Fig. 2 (b) に、断面を観察するために樹脂に埋包して研磨処

Fig. 2 SEM photographs of the coated yeast cells

理をした粒子のSEM像を示した。この断面写真より、膜はおおよそ $0.2\mu\text{m}$ 程度の厚さであることが分かる。また、写真手前に見える中空粒子内部にも出芽痕の形跡を認めることができる。未熱処理状態のコーティング粒子であることから、本来ならば粒子内部には酵母が存在するものと考えられるが、埋包研磨処理、および、その際の洗浄により酵母由来の有機物は消失し、確認することはできなかった。

一般にコーティング膜形成には、不均一核形成¹²⁾が必要となるが、その膜形成機構としては各種のものが提案されている。Sugiyasuらは、バイオテンプレートリングによるシリカ膜形成の機構として、アルコキシド分解物と細胞壁間の静電引力や水素結合が重要であることを指摘している⁹⁾。また、生体膜への結晶析出においては、生体膜上の極性脂質、糖鎖、膜タンパク質が不均一核生成の場として作用することが知られている¹³⁾。今回の実験においては、析出溶液のpH範囲(pH10~11)のゼータ電位の測定結果から、酵母表面は負に帯電しており、アルコキシド分解物もやはり負に帯電していると考えられるため、静電的相互作用の寄与は少ないものと考えられる。よって、静電相互作用以外の機構、例えば生体膜上の脂質のリン酸、糖、あるいはタンパク質が初期核生成に寄与して

Fig. 3 SEM photograph of the yeast cells prepared by the zirconium butoxide without TEA

いるものと考えられる。一方、エタノール溶媒中でTEAを添加していないZNBを用いてコーティング処理を行うと、Fig. 3に示すように、加水分解物と酵母の凝集体が形成された。これは酵母内に水が存在しているため、ZNBが酵母表面近傍で活発に加水分解し、酵母と多量の生成物が凝集したものと考えられる。このようなコーティング膜の形成過程は、生物としての酵母細胞の構造に由来するものであり、バイオテンプレートという観点からは興味深いものと考えられる。

3. 2 熱処理の影響

コーティング処理をした酵母、その対照としての酵母、およびTEA添加ZNBより生成したジルコニア加水分解物について、TG、DTG及びDTAを測定した結果をFig. 4に示す。これらの試料は、熱分解過程を明確にするために、あらかじめ312K、12時間という乾燥処理をしたものを使用した。

Fig. 4の結果は、473Kまでの脱水過程と、それ以降の有機物の燃焼過程やジルコニアの結晶化過程に対応する高温域、といった二つに分けることが可能であると考えられる。まず、脱水過程を比較すると、DTAの吸熱温度及びDTGより、脱水速度が最大になる温度及び減少量は酵母323K、12%、コーティング処理をした酵母338K、8%及びジルコニア加水分解物333K、15%であった。これらのことは、ジルコニア加水分解物に含まれる水分や表面水酸基が、酵母内の水分より蒸散しにくいことを示している。乾燥過程が内包される酵母において先行することは、被覆粒子の乾燥という観点からは好ましいものと考えられる。

次に、高温域について見てみると、まず、酵母で

Fig. 4 TG-DTG-DTA curves of the samples ;
(a) yeast cells (b) coated yeast cells
(c) the powder prepared by ZNB

Fig. 5 Powder XRD patterns as a function of annealing temperature ;
▽: monoclinic peaks, ★: tetragonal peaks

は、大きな二つのピークが認められることが特徴的であった。573K 付近の大きなピークは有機物の燃焼に対応するものと考えられる¹⁴⁾。一方、743K 付近のピークは単純な有機物の分解温度としては高すぎることから、酵母に含まれるリン等の灰分が有機分解物に作用し、その一部を難燃化したことがその原因として推定される¹⁵⁾。ジルコニア加水分解物においては、アルコキシド由来の残留有機物の燃焼や水酸化物の脱水反応が523K 付近で生じ、773K まで続き、34% 減少した。そして、コーティング処理した酵母においては、上述の酵母とジルコニア加水分解物との燃焼を組み合わせた燃焼挙動を示していると考えられる。しかしながら、酵母で743K 付近であったピークがコーティング処理した場合には773K に移動するなど、コーティング膜の存在により熱分解反応がおおよそ30K 程度高温域に移動していることが認められる。その結果、中空粒子として酵母由来の成分を消失させるためには、823-873K 程度までの熱処理が必要であることが分かる。また、TG 曲線において、酵母とコーティング処理の1273K における残渣を比較すると、コーティング処理が22%、酵母が6.5%である。ジルコニア加水分解物の残渣が62%、焼失物38%であることから、コーティング処理した場合の未熟の状態ではジルコニアが17%、ジルコニウム加水分解物の焼失分が11%、酵母の無機物が5%、酵母の焼失分が67%となる。

次に、無機物の結晶化過程についてみると、ジルコニア加水分解物のDTAに現れる673K 付近の

Fig. 6 SEM photographs of coated yeast cells at different annealing temperature (a) 773K (b) 973K (c) 1273K for 3h in air

ピークは、ジルコニア正方晶系への移転と同定されているものに相当する¹⁶⁾。これら結晶化過程についての知見を得るために、コーティングした酵母を各種温度、空气中で熱処理した試料のXRD測定を行った結果をFig. 5に示す。熱処理前のアモルファス状態から、773K付近で結晶化が始まり、973Kではほぼ正方晶への結晶化が完結しているものと思われる。さらに、1273Kでは単斜晶への移転が進行し、正方晶と単斜晶が共存していた。

このような熱処理による粒子形態の変化を、SEM

Fig. 7 (a) SEM photograph of coated yeast cells heated at 1273K for 3h in N₂

Fig. 7 (b) TG and DTG curves of the yeast cells in N₂

により観察した (Fig. 6)。773K、973Kさらに1273Kと高温での熱処理になるに従い、ジルコニア中空粒子が次第に収縮していく様子が観測された。熱処理前では2から4μmであったものが、熱処理後には1から2μmと約半分の大きさになっていた。また、熱処理前には比較的滑らかな表面を持つ楕円状の形態が、熱処理後は多くのものがしぼんだ形に変化した。このような形態変化は、ジルコニア中空粒子を機能性粒子として活用する場合には好ましいものと考えられる。

一方、コーティング処理粒子を窒素中で熱処理すると、例えば1273Kという高温の処理を行っても、Fig. 7 (a)に示すように、粒子としての収縮も少なく、また、元のままの形状を維持した中空粒子を得ることが可能であった。このことは、窒素中での酵母の熱分析結果 (Fig. 7 (b))に示すように、還元性雰囲気においては重量減少が1113Kまで続き、酵母の細胞壁構造がかなり的高温域でも安定に存在し続けることが可

Fig. 8 Powder XRD pattern of the coated yeast cells heated at 1273K for 3h in N_2
★ : tetragonal peaks

Fig. 9 TEM photographs of the section of hollow zirconia spheres

能であり、テンプレートとしての機能が維持されていたためと考えられる。また、その結晶形をX線回折により調べてみると、Fig. 8に示すように、1273Kの熱処理においてもジルコニアは正方晶のままであった。これは、酸素分圧によりジルコニウムイオンの拡散係数が異なるために窒素雰囲気中では転移が進行しなかったためであると考えられる¹⁷⁾。

3.3 ジルコニア膜の性状

中空粒子膜の状態を調べるため、Fig. 9に、TEA/ZNB比が1の場合の973Kで3時間熱処理した粒子のTEM写真を示す。中空粒子を透過によって観察した粒子周辺部に膜厚と考えられる黒い部分は0.1 μ mであった。ここで、酵母の細胞壁をラクトースなどの糖の密度として2g/cm³、酵母の直径3 μ m、細胞壁の厚さが0.2 μ mと仮定すると、一つの乾燥した粒子が9.8 μ gとなる。熱分析の結果による酵母とジル

Fig. 10 SEM photograph of the section of hollow zirconia spheres

コニアとの比率24%、ジルコニアの密度6g/cm³、さらに、コーティング処理した粒子を熱処理して直径1.6 μ mの中空粒子になったと仮定すると、約0.05 μ mの膜が形成すると計算され、空隙率を考慮すると、実際の膜厚とはそれほどかけ離れてはいない。

その膜は数ナノメートルの結晶化した粒子から構成されており、EDS分析によると、酸素を除く原子重量96%がジルコニウム、その他がリン、カリウム、ケイ素などから構成されていた。このことから、膜は熱処理により酵母に存在した無機物を取り込むと考えられる。また、TEA/ZNB比を0.6とすると、膜厚は0.25 μ mに増加していた(Fig. 10)。これは、TEA/ZNB比を小さくすることにより、コーティング液の加水分解性が増加し、今回の反応時間である60時間において膜としての析出量が増加したためであると考えられる。

4. 結 論

酵母をテンプレートとしたジルコニア中空粒子作製について以下の知見を得ることができた。

- 1) トリエタノールアミンを安定化剤として使用したジルコニウムブトキシドにより、酵母の表面にジルコニアをコーティングすることができた。その際のTEA/ZNB比は0.6から1が適当であった。
- 2) コーティング処理した酵母を熱処理することにより、ジルコニア中空粒子を作製することができた。熱分解条件を制御することにより中空粒子の収縮率や形状を変化させることが可能であった。
- 3) 973K 3時間の熱処理条件では中空粒子の膜厚は0.1から0.25 μ mであり、その膜は数ナノメートルの結晶粒子から構成されていた。

References

- 1) Ameil, O., R. Salmon, F. Weill and J. M. Heintz : "Characterization of Aerosol-Prepared Tantalum Oxide Particles", *J. Colloid Interface Sci.*, **166**, 14-22 (1994)
- 2) Takatori, K. : "Complex-oxide Synthesis by Emulsion Combustion Method (ECM)", *Toyotachuokenkyujo R & D Review*, **32**, 1-12 (1997)
- 3) Shi, X., A. L. Briseno, R. J. Sanedrin and F. Zhou : "Formation of Uniform Polyaniline Thin Shells and Hollow Capsules Using Polyelectrolyte-Coated Microspheres as Templates", *Macromolecules*, **36**, 4093-4098 (2003)
- 4) Ding, X., K. Yu, Y. Jiang, H. Bala, H. Zhang and Z. Wang : "A Novel Approach to the Synthesis of Hollow Silica Nanoparticles", *Materials Letters*, **58**, 3618-3621 (2004)
- 5) Kresge, C. T., M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli and J. S. Beck : "Ordered Mesoporous Molecular Sieves Synthesized by a Liquid-Crystal Template Mechanism", *Nature*, **359**, 710-712 (1992)
- 6) Imhof, A. and D. J. Pine : "Ordered Macroporous Materials by Emulsion Templating", *Nature*, **389**, 948-951 (1997)
- 7) Numata, M., K. Sugiyasu, T. Hasegawa and S. Shinkai : "Sol-Gel Reaction Using DNA as a Template : An Attempt Toward Transcription of DNA into Inorganic Materials", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 3279-3283 (2004)
- 8) Davis, S. A., S. L. Burkett, N. H. Mendelson and S. Mann : "Bacterial Templating of Ordered Macrostructures in Silica and Silica-Surfactant Mesophases", *Nature*, **385**, 420-423 (1997)
- 9) Sugiyasu, K., S. Tamaru, M. Takeuchi, D. Berthier, I. Huc, R. Oda and S. Shinkai : "Double Helical Silica Fibrils by Sol-Gel Transcription of Chiral Aggregates of Gemini Surfactants", *Chem. Commun.*, 1212-1213 (2002)
- 10) Aida, H. et al. : "Sinban Oyo Biseibutugaku I", p.85, Asakura Shoten (1981)
- 11) Takahashi, Y. : "Preparation of Nano Thin Films of Oxides", *Kagaku Kogyo*, **39**, 482-491 (1988)
- 12) Nihon kessyoseicho gakkai : "Kessyo Seicho Handobukku", p. 147, Kyoritsu (1995)
- 13) Sato, K. : "Yoeki karano Kessyo Seicho", p. 29, Kyoritsu (2002)
- 14) Padmavathy, V., P. Vasudevan and S. C. Dhingra : "Thermal and Spectroscopic Studies on Sorption of Nickel (II) Ion on Protonated Baker's Yeast", *Chemosphere*, **52**, 1807-1817 (2003)
- 15) Kanbe, H. : "Netsubunseki", p.300, Koudansha (1975)
- 16) Kundu, M. and D. Ganguli : "Monolithic Zirconia Gels from Metal-Organic Solutions", *J. Mater. Sci. Lett.*, **5**, 293-295 (1986)
- 17) Hori, S. : "Sintering Mechanism of Ceramics and Its Manipulation", *Shikizai*, **63**, 402-419 (1990)