

熊本県産業技術センター

研 究 報 告

第 56 号 令和 2 年度

.....
REPORTS OF
KUMAMOTO INDUSTRIAL RESEARCH
INSTITUTE
No.56 2020.4-2021.3
.....

令和 3 年（2021 年）12 月

熊本県産業技術センター
〒862-0901 熊本市東区東町 3-11-38

Published by
Kumamoto Industrial Research Institute
3-11-38, Higashi-machi, Higashi-Ku, Kumamoto 862-0901 Japan

熊本県産業技術センター研究報告

第 56 号 (令和 2 年度)

目 次

【論 文】

米ゲルの特性と利用に関する研究	水上浩之	1
	峯田絵理	
	白尾謙典	
	友田幸利	
	花城勲	
	三牧奈美	

【技術資料】

次世代産業に適応する機械要素技術の高度化に関する研究	甲斐彰	7
- 生栗の一次加工の機械要素の開発 -	村井満	
	山口良一	
	百田寛	
	斎藤幸雄	
食品周辺産業支援に関する技術開発	百田寛	13
-シルクパウダーの工業的用途創出に向けた取組み-	甲斐彰	
	斎藤幸雄	

【転 載】

Totally-Organic Near-Infrared Shielding Materials by Conductive Cellulose Nanofibers YOSHIDA Kyohei, NAGAOKA Shoji, HORIKAWA Maki, NOGUCHI Hiroki and IHARA Hirotaka		17
Thin Solid Films, Vol. 709, pp. 138221-138228 (2020)		
Activated Sludge Microbiome in a Membrane Bioreactor for Treating Ramen Noodle-Soup Wastewater TANAKA Ryoichi, NOUZAKI Katsuya, Ronald R. Navarro, INABA Tomohiro, AOYAGI Tomo, SATO Yuya, OGATA Atsushi, YANAGISHITA Hiroshi, HORI Tomoyuki and HAGE Hiroshi		25
The Journal of General and Applied Microbiology, Vol. 66, pp. 339-343 (2020)		
キトサン微粒子のストレプトコッカス ミュータンスに対する抗菌効果と 歯磨材としての研磨効果	齋田佳菜子	30
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 84, pp. 1265-1273 (2020)	永岡昭二	
	城崎智洋	
	堀川真希	
	伊原博隆	

【特別報告】

10 年大型プロジェクト・くまもと有機薄膜技術高度化支援センターの完結	永岡昭二	38
－ 熊本県における有機エレクトロニクス事業の展開 －	松枝寛 土村将範	

REPORT OF
KUMAMOTO INDUSTRIAL RESEARCH INSTITUTE

Vol. 56 (2020. 4–2021. 3)

CONTENTS

【Original paper】

Research on the Characteristics and Utilization of Rice Gel

MIZUKAMI Hiroyuki, MINEDA Eri, SHIRAO Kensuke, TOMODA Yukitoshi,
HANASHIRO Isao and MIMAKI Nami 1

【Technical Reports】

Improvement of Mechanical Element for Advanced Industries

–Development of a Mechanical Element for Chestnuts Primary process –

KAI Akira, MURAI Mitsuru, YAMAGUCHI Ryouichi, MOMOTA Hiroshi and SAITO Yukio 7

Technological Development for Support of Food-Related Industries

– Approach for Industrial Applications of Silk Powder –

MOMOTA Hiroshi, KAI Akira and SAITO Sachio 13

【Reprinting】

Totally-Organic Near-Infrared Shielding Materials by Conductive Cellulose Nanofibers

YOSHIDA Kyohei, NAGAOKA Shoji, HORIKAWA Maki,
NOGUCHI Hiroki and IHARA Hirotaka 17

Thin Solid Films, Vol. 709, pp. 138221–138228 (2020)

Activated Sludge Microbiome in a Membrane Bioreactor for

Treating Ramen Noodle-Soup Wastewater

TANAKA Ryoichi, NOUZAKI Katsuya, Ronald R. Navarro, INABA Tomohiro,
AOYAGI Tomo, SATO Yuya, OGATA Atsushi, YANAGISHITA Hiroshi,
HORI Tomoyuki and HAGE Hiroshi 25

The Journal of General and Applied Microbiology, Vol. 66, pp. 339–343 (2020)

Dispersible Chitosan Particles Showing Bacteriostatic Effect against

Streptococcus Mutans and their Dental Polishing Effect

SAITA Kanako, NAGAOKA Shoji, SHIROSAKI Tomohiro, HORIKAWA Maki and
IHARA Hirotaka 30

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 84, pp. 1265–1273 (2020)

【Special Report】

Completion of Large Project, ” Kumamoto Institute for Photo-Electro Organics (PHOENICS) ”

– Development of Photo-Electro Organics Project in Kumamoto Prefecture –

NAGAOKA Shoji, MATSUEDA Hiroshi and TSUCHIMURA Masanori 38

米ゲルの特性と利用に関する研究

水上 浩之*・峯田 絵理**・白尾 謙典**・友田 幸利***・花城 勲****・三牧 奈美*

*食品加工技術室、**食品加工技術室（現：上益城農業普及振興課）、

技術交流企画室（現：農林水産部団体支援課）、*鹿児島大学農学部

Research on the Characteristics and Utilization of Rice Gel

MIZUKAMI Hiroyuki*, MINEDA Eri**, SHIRAO Kensuke**, TOMODA Yukitoshi***, HANASHIRO Isao****
and MIMAKI Nami**

高アミロース米を加熱糊化して高速せん断攪拌の「ダイレクトGel転換」を行って製造する「米ゲル」は、米の品種、製造条件を変化させることにより物性が変わることから、さまざまな食品への利用が期待されている。本研究では、米ゲルの利用を図る目的で、米ゲルの物理的特性および米ゲル澱粉の構造解析を行い、両者の関係について検討するとともに、米ゲルを利用した食品の試作を行った。

1. はじめに

近年、我が国では米を主食以外のいろいろな用途に用いる新規需要米に注目が集まっており、米を粉末やペーストに1次加工して、パンや菓子、麺等の加工品が作られている。米ゲルも新規需要米を利用した新しい米の素材であり、農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所(当時)で開発されたものである¹⁾。本センターにおいても、米の消費拡大、需要拡大を目的に、新しい食品素材としての利用法を確立するため、米ゲルの研究に取り組むことにした。

米ゲルは、加水した高アミロース米を加熱糊化(炊飯)した後、高速せん断攪拌(ダイレクトGel転換)して得られるゲル状の食品素材である^{1) 2)}。米ゲルはその製造条件によって軟らかいゼリー状から高弾性のゴムボール状のものまで幅広い物性の制御が可能で、炊飯、高速攪拌という簡単な工程のため、低コスト生産が可能という利点をもつ。また、小麦粉や卵の代替として、お菓子、パン、麺等に利用できることからアレルギー対応食やグルテンフリーの健康食になるとも考えられ、様々な商品開発も進められている³⁾。

高アミロース米は高速せん断することで、硬くしつかりしたゲルが形成されることが知られている⁴⁾。加えて、この米ゲルは、パンなどに使用すると老化が緩やかで硬くなりにくく、離水しにくい等の特徴を持ち²⁾、米ゲルを小麦粉パン生地添加到することによりパンのテクスチャーを改善できることが報告されている⁵⁾。

そこで、本研究では、米ゲルの特徴を把握し多様な食品の加工製造に資するため、米ゲルの物理的特性と米ゲルの構造解析を行った。また、米ゲルの利

用法の例として、パンおよび他の食品の試作を行った。

2. 試験方法

2.1 試料

原料米として使用した高アミロース米(品種名: ミズホチカラ)は、熊本県農業研究センター農産園芸研究所(熊本県合志市合志町大字栄3801)で栽培された2018年産を使用した。それ以外の品種は市販のものを使用した。

2.2 米ゲルの製造方法

- ①精米したミズホチカラ150gに1.5倍量の水を加え、攪拌式洗米器で10回攪拌した後、水を捨てる操作を5回繰り返した。
- ②米の2倍量になるように加水し450gに調整した。
- ③室温で2時間浸漬した後、象印マホービン(株)製炊飯器(NP-VB10-TA)の「おかゆコース」で炊飯した。
- ④炊き上がり後、10分間蒸らし、直ちに(株)エフ・エム・アイ製カッターミキサー(BLIXER-5Plus, Robot-Coupe)でせん断し、米ゲルを製造した。
- ⑤加水量の異なる米ゲルは、炊飯器で炊飯する際の加水量を調整して製造した。
- ⑥せん断条件は、回転数1800rpm、せん断時間は1、2、3、5、10、15、30、45、60分で行った。

2.3 米ゲルの物理的特性測定

米ゲルの物理的特性は、製造直後の米ゲルを30℃まで降温し、直径40mmの亚克力製のリング容器(高さ15mm)に入れて、山電(株)製クリープメーター

(RE2-3305B)でテクスチャー解析による付着性を測定した。また、リング容器に入れたゲルを4℃で保存し測定直前にリングから取り出して破断強度を測定した。測定は製造後5日間連続して行った。米ゲルの粘度は、(株)NSP製のRapid Visco Analyzer (RVA)で測定した。製造直後の米ゲルを30℃まで降温し、20gをアルミ缶に入れ、92℃まで昇温させ6分間保持後、60℃に降温し20分間保持した値を粘度とした。ローター回転速度は0-15分;100rpm、15-50分;50rpmで行った。

2.4 試料の調製方法

米ゲルの澱粉は、真空凍結乾燥処理した各米ゲルをアルカリ浸漬法⁶⁾で処理して調製した。また、温水抽出試料は、米ゲルを248倍量の水に懸濁した後、沸騰浴中で10分間加熱し、遠心分離(3000rpm、5min)した溶液から上澄液を分離した。等量のエタノールおよび2MNaClを終濃度10mMになるように加え水中で2時間冷却した後、遠心分離で得た沈殿を凍結乾燥している。得られた澱粉および温水抽出物中のアミロペクチンはTakeda et al.⁷⁾の方法を用いて調製した。

2.5 米ゲル澱粉の構造解析

澱粉およびアミロペクチンの鎖長分布は、Hanashiro et al.⁸⁾の蛍光標識ゲルろ過HPLC法で測定した。

2.6 パンの製造方法と評価法

米粉(パン用米粉:ミズホチカラ)230g、砂糖20.7g、塩4.6g、オリーブオイル5.75g、イースト4.6g(2%)の割合で作る米粉パンを基本に、Panasonic(株)製ライズブレッドクッカー(SD-RBM1001)の「早焼き食パンコース」で製造した。米粉の一部を米ゲルで置換したパンは、米ゲル中の米重量と水分量を米粉100%パンの配合量から差し引いている。なお、パンは焼成後1時間常温静置し、高さで菜種置換法⁹⁾で求めた比容積で評価した。

3. 結果および考察

3.1 米ゲルのせん断時間と物理的特性との関係

製造直後の米ゲルは、せん断時間が長くなるほど軟らかく滑らかなゲルになることから、せん断時間の異なる米ゲルの特性を調べるために、それぞれのゲルの物理的特性を調べた。表1及び図1にせん断時間と硬さとの関係を示す。硬さは破断強度の値で示

した。老化した米ゲルを圧縮した時、破断することなく測定できる点は歪率10%であったことから、硬さは歪率10%、試料表面から1.5mmまで圧縮した時の値とした。製造直後(0day)の硬さは、いずれのゲルも違いはみられず、せん断時間の影響はほとんどなかった。また、製造後4℃で保存した場合、いずれの米ゲルも老化し硬くなったが、せん断時間が長い方がより硬くなる傾向がみられた。

表1 せん断時間と米ゲルの破断強度との関係

経過日数	せん断時間(min)							
	1min	3min	5min	10min	15min	30min	45min	60min
0day	0.09	0.08	0.07	0.07	0.08	0.10	0.10	0.10
1day	1.27	1.96	1.59	2.18	2.18	2.63	2.72	2.67
3day	9.53	12.2	10.3	12.0	13.0	14.3	14.4	16.4
5day	17.7	20.3	18.9	21.7	23.4	23.7	24.4	26.1

※1 0dayは製造後30℃に降温したゲルを直径40mmの亚克力製のリング容器(高さ15mm)に流し込み測定した

※2 1~5dayは流し込んだゲルを4℃で保存したものを測定した

※3 直径8mmのプランジャー、圧縮速度1mm/sec

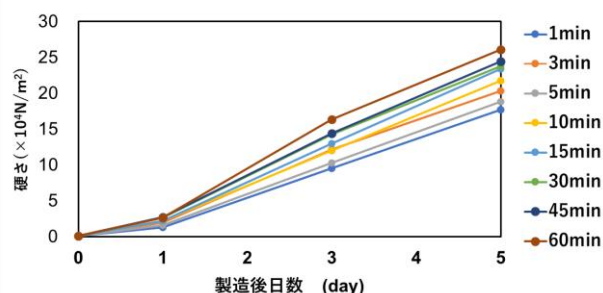
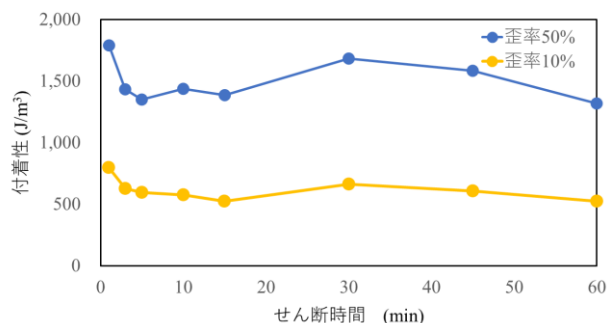


図1 せん断時間の異なる米ゲルの破断強度の推移

ここで、せん断時間と米ゲルの付着性との関係を図2に示す。クリープメーターのプランジャーの直径は16mm、測定速度は5mm/secで行い、歪み率10%と50%での変化を測定している。付着性は、せん断時間5分までに大きく低下するが、その後は30分でやや増加するものの大きな変化はなかった。



※1 製造後30℃に降温したゲルを、直径40mmの亚克力製のリング容器(高さ15mm)に入れて測定

※2 直径16mmのプランジャー、測定速度は5mm/sec

図2 せん断時間と米ゲルの付着性との関係

次に、ゲルの流動性を調べるために、RVAによる粘

度測定を行ったときの粘度曲線を図3に示す。米ゲルに流動性を持たせるために、最初92℃まで昇温し高速で攪拌した後60℃まで降温し、そのまま保持した時の粘度曲線である。RVA曲線ではせん断時間1分の米ゲルの粘度が最も高く推移し、温度60℃における粘度も他のゲルよりも高く推移した。次いで、3分せん断ゲルの粘度が高く、せん断時間5分以降の米ゲルの粘度の差は小さかった。

図4にせん断時間と60℃保持後10分間のRVA粘度の平均値との関係を示す。グラフより、せん断時間1分から5分までに米ゲルの粘度は大きく低下するが、それ以降のせん断の粘度変化は非常に小さいことがわかった。また、図2で示した付着性のグラフとも非常に類似した結果を示した。

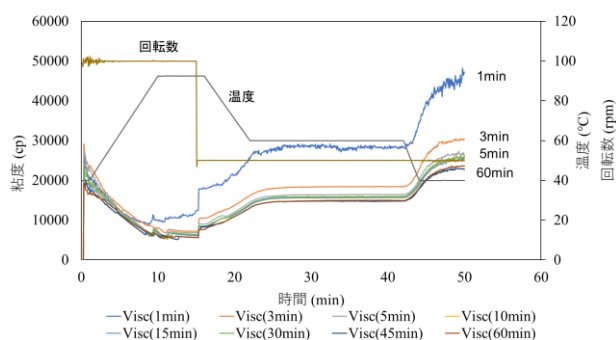


図3 せん断時間の異なる米ゲルの粘度曲線

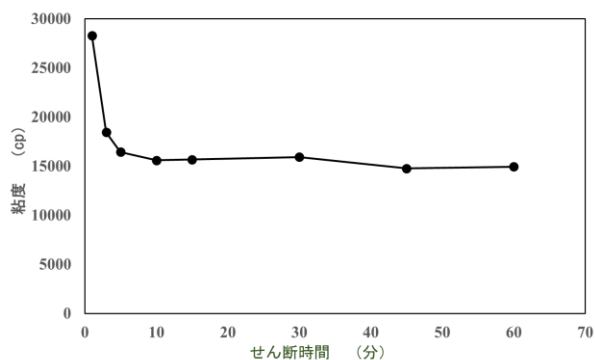


図4 せん断時間と米ゲルの粘度との関係

3.2 せん断時間の異なる米ゲルパンの製造

せん断時間を変化させた米ゲルを用いたパンを製造した（図5）。ここでは、米粉中の米ゲルの置換割合は20%とした。表2に置換したそれぞれのパンの高さ、体積、比容積を示す。せん断時間を長くするほどパンの高さ、体積は高くなり、重量は逆に低くなる傾向を示しており、比容積もせん断時間が長いほど高くなった。また、パンの生地表面と食感は、せん断時間が短いとキメは粗く、ボソボソとした食感を示したのに対し、長くすると表面のきめが細かく

なり、むしろべたつくような食感を示した。その中でも、せん断時間5分～30分のパンの食感はいずれも比較的好評であった。それぞれのパンの特徴の違いは、置換した米ゲルのせん断時間による特性の違いによるものと考えられる。

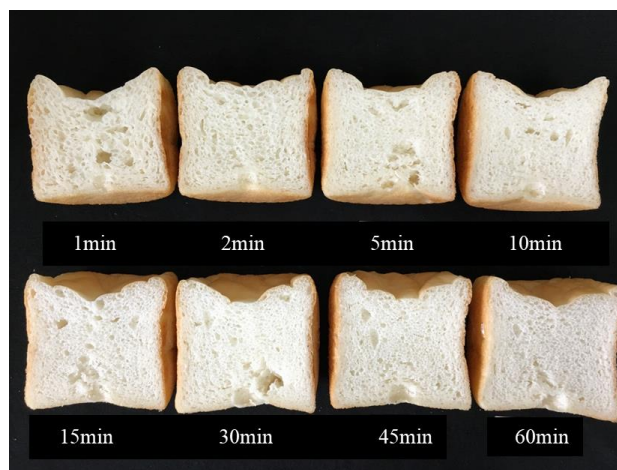


図5 せん断時間の異なる米ゲルパン

表2 米ゲルパンの評価

せん断時間 (min)	高さ (mm)	重量 (g)	体積 (ml)	比容積
1	98.70	411.06	1170	2.85
2	101.09	410.18	1235	3.01
5	100.85	407.45	1275	3.13
10	103.87	407.14	1365	3.35
15	103.88	408.88	1275	3.12
30	103.87	410.49	1325	3.23
45	103.96	405.68	1295	3.19
60	103.40	406.73	1300	3.20

3.3 米ゲルの澱粉構造解析

米ゲルの特性は、米の主成分である澱粉が影響していることが考えられたため、せん断により澱粉構造に変化がないか分析を行った。図6は米ゲル中の澱粉の鎖長分布を示したもので、表3はそのクロマトグラムの重量分布および数分布から求めた各鎖長分布の割合を示したものである。米ゲルの凍結乾燥粉末から調製された澱粉に、イソアミラーゼを作用させ枝切りした後、ゲルろ過カラムで画分し、HPLCで単位鎖（枝）の分布を調べた。その枝の鎖長の大きさから、図6に示すようにApp. AM（見かけのアミロース）画分、B2+B3画分、A+B1画分に分けられ、その割合を示したのが表3である。0-60分間のいずれのせん断時間においても、重量割合ではApp. AM画分は15.8-17.6%、B2+B3画分では19.5-21.4%、A+B1画分では61.5-64.1%とほぼ同量で、数割合でもそれぞれ0.5-0.

7%、9.2-9.7%、89.7-90.3%と、せん断時間を変化させても澱粉全体の鎖長分布に大きな差は認められなかった。

更に、澱粉試料から調製したアミロペクチンの鎖長分布と温水抽出物から調製したアミロペクチンの鎖長分布（両者データ無掲載）においても、せん断時間の違いによる変化は認められなかった

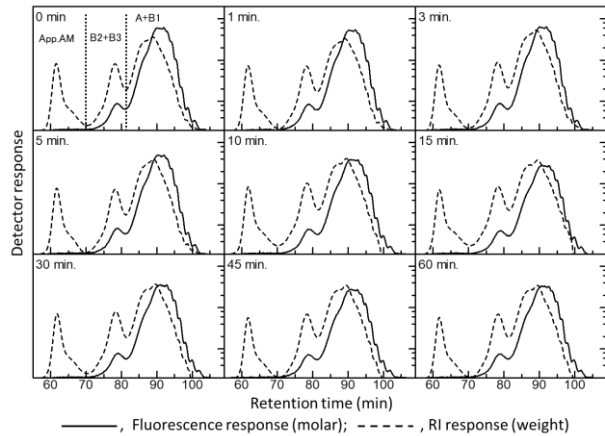


図6 米ゲル中の全澱粉の鎖長分布

表3 米ゲル中の全澱粉の鎖長分布

Mixing time (min)	Fraction (weight %)			Weight ratio (A+B1)/(B2+B3)	Fraction (mole %)			Molar ratio (A+B1)/(B2+B3)
	App. AM	B2+B3	A+B1		App. AM	B2+B3	A+B1	
0	16.5	21.4	62.1	2.9	0.5	9.5	89.9	9.5
1	15.8	20.0	64.1	3.2	0.6	9.2	90.2	9.8
3	16.6	20.7	62.6	3.0	0.7	9.5	89.8	9.5
5	16.9	20.5	62.6	3.1	0.6	9.5	89.9	9.5
10	17.0	20.1	62.9	3.1	0.6	9.7	89.7	9.3
15	17.6	20.9	61.5	2.9	0.7	9.4	90.0	9.2
30	16.5	21.2	62.2	2.9	0.7	9.4	89.9	9.6
45	16.8	20.2	63.0	3.1	0.5	9.2	90.3	9.8
60	16.5	19.5	64.0	3.3	0.7	9.4	89.9	9.6

温水抽出試料中の澱粉の分析を行った結果では、RI検出器で検出された見かけのアミロース画分の割合（App. AM）はせん断時間が長くなるに伴い低下する傾向が認められ（図7、表4）、蛍光検出で測定した強度においても同様の傾向が認められた。このことから、せん断処理が温水抽出時のアミロースの挙動を変化させ、せん断が進行すると難抽出性のアミロース量が増加することが示唆された。この温水抽出されたアミロース量の低下は、せん断時間が長くなるに伴い、澱粉内部でアミロースのネットワークが形成されるために起こるのではないかと推測された。

アミロペクチンの構造について調べるために、ゲルの凍結乾燥粉末および温水抽出物それぞれの澱粉からアミロペクチンを分別調製して、その鎖長分布について調べたが、せん断時間が変化しても鎖長分布の差は認められなかった（データ掲載無）。

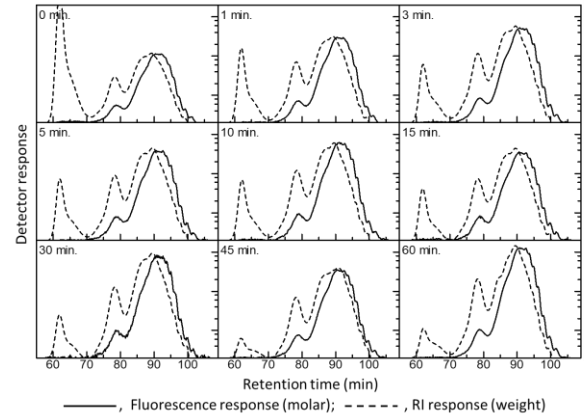


図7 米ゲルの温水抽出画分中の澱粉の鎖長分布

表4 米ゲルの温水抽出画分中の澱粉の鎖長分布

Mixing time (min)	Fraction (weight %)			Weight ratio (A+B1)/(B2+B3)	Fraction (mole %)			Molar ratio (A+B1)/(B2+B3)
	App. AM	B2+B3	A+B1		App. AM	B2+B3	A+B1	
0	33.7	16.0	50.4	3.2	1.1	9.3	89.6	9.6
1	17.5	19.8	62.7	3.2	0.4	9.4	90.3	9.7
3	12.9	21.2	66.0	3.1	0.5	9.6	90.1	9.4
5	14.6	20.5	64.9	3.2	0.4	9.4	90.3	9.6
10	13.9	21.3	64.8	3.0	0.4	9.5	90.2	9.5
15	12.6	21.2	66.3	3.1	0.6	9.7	89.8	9.3
30	11.3	20.8	68.0	3.3	0.3	9.4	90.4	9.6
45	5.9	21.5	72.7	3.4	0.3	9.4	90.4	9.6
60	6.7	22.7	70.7	3.1	0.2	9.5	90.3	9.5

そこで、アミロペクチンの主鎖に絞って分析を行った。図8は、米ゲルの真空凍結乾燥粉末試料から分別調製したアミロペクチン主鎖の鎖長分布を示したクロマトグラムで、図9に、温水抽出画分から分別したアミロペクチン主鎖の鎖長分布を示す。図9の温水抽出画分の1分せん断のゲルのクロマトグラムは、図8の0分のアミロペクチン主鎖のクロマトグラムとよく類似した。図8のせん断時間0分は、せん断前の炊飯米であるため普通の米の澱粉と同じと考えられることから、温水抽出画分における1分せん断は一般の米澱粉のクロマトグラムと類似していると言えた。温水抽出画分では、一般のアミロペクチンでは見られないような短いアミロペクチン主鎖が、せん断時間3分までに急激に増加しているが、それ以降のせん断では増加は認められなかった。このことから、せん断処理の初期にはアミロペクチンの低分子化が起こるが、それ以降、せん断時間を延ばしても、それ以上の低分子化は起こらないことが示唆された。

図9中に示す様に、屈折率（RI）と蛍光検出（F）で得られたクロマトグラムのピーク面積の比、RI/Fの値は1分せん断で1.19であったのに対し、せん断時間3分以降は0.3-0.7と低かった。RI/F値は重合度の指標とみなせることから、数平均重合度で約半分程度の大きさに低分子化されたと言える。これは、1分

子当たり1か所で単位鎖が切断されていることを意味している。また、3分以降のせん断は、1分せん断のクロマトグラムでみられる主鎖の蛍光ピークの高さには変化がみられず、B1鎖やA鎖程度の主鎖が増加していることから、単位鎖のクラスターを連結しているB2鎖がクラスター間で切断されて新たな主鎖を生じていることが考えられた。山本らも米澱粉のゲルを高速せん断した場合、アミロペクチン分子にクラスター単位程度の単位の切断を認めており¹⁰⁾、峯田らの報告¹¹⁾と併せ、米ゲルではせん断加工によってアミロースとアミロペクチン超長鎖が安定したネットワークを形成する一方で、アミロペクチン分子がクラスター単位で低分子化することによって老化特性に影響を及ぼしているとして松木¹²⁾は推察している。

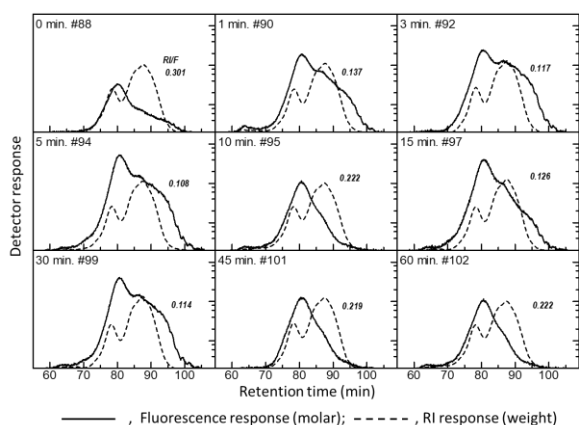


図8 米ゲル粉末試料から分別調製したアミロペクチン主鎖の鎖長分布

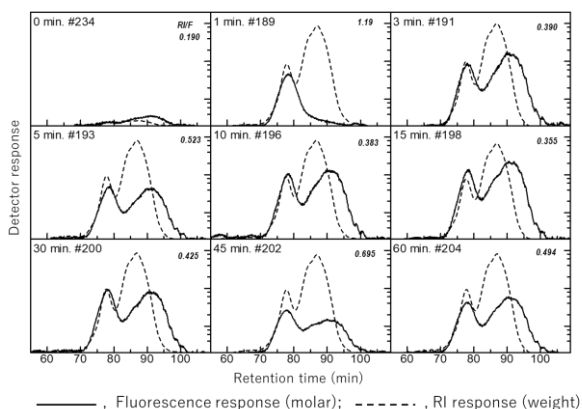


図9 温水抽出画分から分別調製したアミロペクチン主鎖の鎖長分布

3.4 米ゲルの澱粉構造と物性の関係

米ゲルの物理的特性と澱粉の分子構造との関係をみた場合、老化させた米ゲルの破断強度と温水抽出物中のアミロース含量との間に、比較的高い負の相関が認められることがわかった (図10)。

また、付着性 (図2) および粘度 (図4) においては、せん断初期の3分までにいずれも大きく低下しており、アミロペクチンの低分子化の傾向と一致していることから両者の間には関連性があることが推察された。

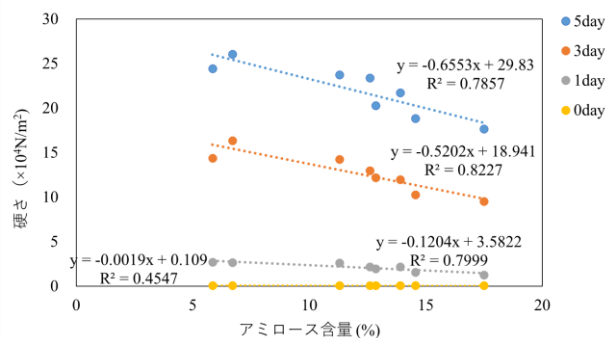


図10 温水抽出アミロース量と米ゲルの破断強度 (硬さ) との関係

3.5 米ゲルの加工食品への利用

3.5.1 ホワイトソース (グルテンフリー)

材料

米 (ミズホチカラ) 100g、豆乳 (または牛乳)
バター 15 g、コンソメ 4.5 g

米ゲルの作り方

- ① 米 100 g を洗米し、2 時間水に浸す。
- ② 水を切り、200 g になるように水を加える。
- ③ 豆乳 (または牛乳) を加えて 1000 g にする。
- ④ ロボクーブで 5 分間攪拌する。

ホワイトソースの作り方

- ① 米ゲル 200g をジップロックコンテナに量り、バターとコンソメを加える。
- ② 電子レンジで 600W、1 分間加熱。
- ③ 蓋を外してかき混ぜる。



3.5.2 牛乳ババロア風プリン

材料

米ゲル (ミズホチカラ、4倍加水) 50g
牛乳 150 g、上白糖 15 g、ゼラチン 2.5g

作り方

- ① 米ゲルをジップロック (袋) で秤量し、湯煎 (90℃、10分間) する。
- ② ①に上白糖を加え混ぜる。
- ③ ボウルに牛乳を入れ加熱。温度が80℃以上になったら、ゼラチンを入れ混ぜる。
- ④ ②に③を少しずつ加え、よく混ぜる。
- ⑤ 容器に移し、常温になったら4℃で2時間冷やす。



3.5.3 チョコレート風ココアゲル

材料

米ゲル（ミズホチカラ、4倍加水）100g

ココア 10g、砂糖 30g

作り方

- ① 米ゲルを80℃湯煎し糊化させる。
- ② ①を秤量し、ココアと砂糖を加え、フードプロセッサーで攪拌して混ぜる。



3.5.4 米ゲル麺

材料（2人分）

米ゲル（ホシユタカ、2倍加水）100g

米粉（パン用米粉）70g、水5cc

作り方

- ① 大きめのボウルに米ゲルを入れ、細かくする。
- ② ①に米粉を入れ、米ゲルと一緒にかき混ぜ、固まりがなくなるようにする。
- ③ 米粉とゲルがなじんできたら、生地を集めてこねて生地を作る。
- ④ まとまったら、生地が乾かないようにして手粉を使って厚さ3-4mm程度に麺棒で伸ばす。
- ⑤ 生地を折って重ねて、適当な幅で切る。
- ⑥ 大きめの鍋にお湯を沸かし、沸騰したら5分程度茹で、茹で上がった後冷水につけて冷やす。



4. 要約

- (1) せん断時間を変化させた米ゲルを米粉パン生地に添加して評価を行った結果、せん断時間の長いゲルを添加したパンほど、高さおよび比容積、高さ と比容積は増加した。
- (2) せん断時間の異なる米ゲルの付着性とRVA粘度は、せん断5分までは大きく低下するが、それ以降の変化は小さかった。
- (3) 米ゲルの温水抽出では、せん断時間が長くなるほど抽出されるアミロース量が低下する傾向が認められた。
- (4) 温水抽出された澱粉中のアミロペクチンの主鎖は3分せん断までは増加したが、それ以降、せん断時間を延ばしても増加はみられなかった。
- (5) 老化させた米ゲルの硬さと温水抽出物中のアミロース含量との間には負の相関性が認められた。
- (6) せん断時間を長くするとアミロースネットワークの形成が進行し、その進行やせん断初期に起こるアミロペクチンの低分子化が米ゲルの物性に影響を及ぼしていると推察された。

米ゲルの食品加工利用に際しては、特許実施許諾を受ける必要があるため、国立研究開発法人農研機構食品研究部門(食品総合研究所)にご相談をお願いします。

参考文献

- 1) 杉山純一，蔦瑞樹，柴田真理朗，富田かおり，米加工素材の製造法，特許第5840904号，2015/11/20
- 2) 杉山純一．ダイレクトGel転換による食品素材「米ゲル」と加工食品への応用．食品と容器 特別解説，56，772-778，2015
- 3) 橋本厚治，米Gel製品ライスジュレ（白米・玄米）の製造と販売，「食品加工総覧 素材」第9巻 追録15号，一般社団法人農山漁村文化協会，東京，pp.86-13-10~86-13-16，2018
- 4) 柴田真理朗，杉山純一，藤田かおり，蔦瑞樹，吉村正俊，粉川美踏，荒木徹也，攪拌処理による高アミロース米のゲル物性の変化，日本食品科学工学会誌，59，220-224，2012
- 5) 藤田かおり，平野由香里，鈴木洋子，柴田真理朗，粉川美踏，松山信悟，杉山純一，Trivittayasil, V.，蔦瑞樹，高速せん断加工によりゲル化した米の添加が食パンの比容積と物性に及ぼす影響．第239回日本作物学会講演会要旨集，230，2015
- 6) Y. Takeda, A. Suzuki and S. Hizukuri, Influence of steeping conditions for kernels on some properties of corn starch. *Starch*, 40, 132-135, 1988
- 7) Y. Takeda, S. Hizukuri and B.O. Juliano, Purification and structure of amylose from rice starch. *Carbohydr. Res.*, 148, 299-308, 1986
- 8) I. Hanashiro, M. Tagawa, S. Shibahara, K. Iwata and Y. Takeda, Examination of molar-based distributions of A, B and C Chains of amylopectin by fluorescent labeling with 2-aminopyridine. *Carbohydr. Res.*, 337, 1208-1212, 2002
- 9) 森 孝夫，「食品加工学実験書」，化学同人，京都，pp. 22，2010
- 10) 山本和貴，中浦嘉子，藤田かおり，川崎明恵，廣瀬美佳，杉山純一，井ノ内直良，米澱粉ゲルの剪断加工における澱粉分子の切断，応用糖質科学，5，B37，2015
- 11) 峯田絵理，宮中宏暢，水上浩之，花城勲，剪断時間の異なる炊飯米ゲルの物理的特性と澱粉構造との関係，応用糖質科学，9，B38，2019
- 12) 松木順子，米ゲルの特性解析と利用について，日本調理科学，53，No. 1，53-56，2020

次世代産業に適応する機械要素技術の高度化に関する研究

－ 生栗の一次加工の機械要素の開発 －

甲斐 彰*、村井 満**、山口 良一*、百田 寛**、斎藤 幸雄**

* ものづくり室（現：技術交流企画室）、** ものづくり室

Improvement of Mechanical Element for Advanced Industries

－Development of a Mechanical Element for Chestnuts Primary process－

KAI Akira*, MURAI Mitsuru**, YAMAGUCHI Ryoichi*, MOMOTA Hiroshi** and SAITO Yukio**

本研究では食料品関連が熊本県の工業の大きな割合を占めていることに着目し、この業界が今後も地場産業をけん引すると考え、食品加工における生産性向上および付加価値の向上に資する機械装置の開発に取り組んだ。ここでは栗の加工を例に不定形な加工対象の加工を高効率、低コストで実現できる機械要素の開発を目的に、工業計測や数値解析、デジタル技術による検討を行うとともに、実用性を重視した実験機を設計製作し、機械要素について検証を行った。

1. はじめに

日本の総人口減少と高齢化社会の到来、健康志向から来る食事制限療法の流行などは、加工食品・飲料の消費量の低下に影響すると予測されており、中小企業が多い食品加工機業界¹⁾は今後も競争が激化するものと考えられている²⁾。農産県である熊本県においても、食料品は事業所数および従業者数が県内工業の構成比の第1位であり、その数は桁違いに多いことから（図1）、平均的な現金給与額は他業種よりも低くなるため、競争力の確保や付加価値の向上は大きな課題である。さらに、小人数の事業所が多いことから、高額な設備投資は容易ではないことが想定される。

一方、農産品については海外からの輸入量が増加し、国内の各地域では価値の高いもので対抗せざるを得ない状況になっている。熊本県では、栗の出荷量が全国トップレベル³⁾にあるものの、中国・韓国からの輸入品との競争を強いられている。しかも、他の農産品と同じく、生産者の高齢化、栽培面積の減少の課題を抱えており、高い付加価値を与える加工の開発が望まれている。栗加工品のうち、ポリフェノールを多く含む渋皮（図2）を残したものは高級菓子の素材として高い価値を有している。しかしながら、素材として生栗は形状や品質が一定ではなく、渋皮の傷が許されない、いわゆる難加工であるため、コストの観点による理由も含めて加工機の発展は遅れている。

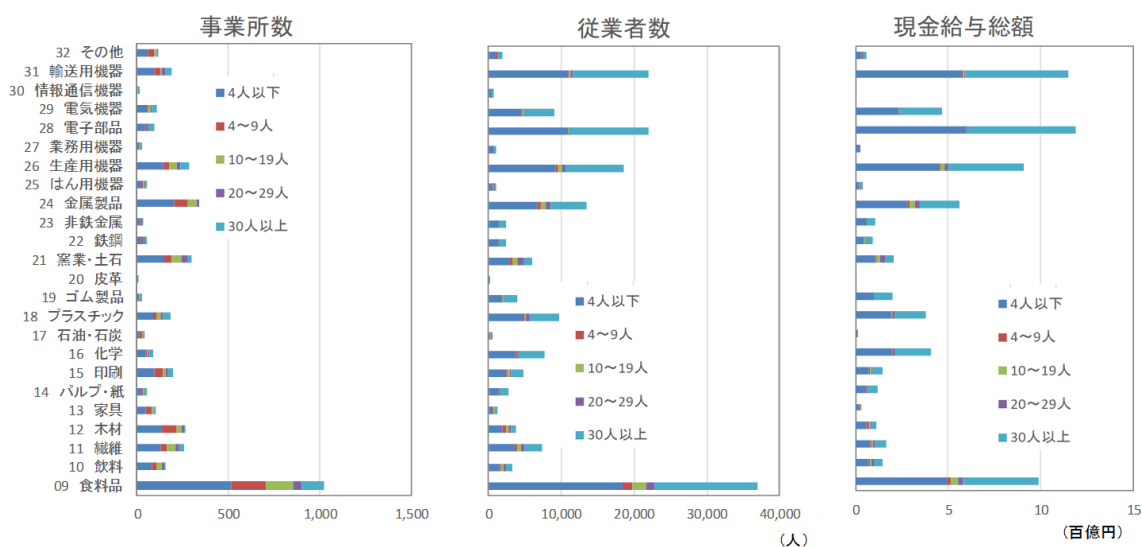


図1 熊本県の工業（平成29年工業調査結果（確定版）より著者作成）

こうした状況に鑑み、小規模かつ、不定形な農産物の加工の安定化が、食品加工における高付加価値化につながる機械要素の高度化の一つの方向であると見据え、本研究では工業計測および各種デジタル技術の適用の試みと、実験による機械要素の検証を行った。



図2 生栗の皮

具体的には、不定形な栗に対して高効率、低コストで加工を実現できる機械要素の開発を目的に下記の項目を実施した。加工原理を見出すために工業計測により加工物となる生栗を定量的に評価し、複数の加工プロセスについてデジタル技術による検討を行った。さらに、これらの結果から着想した実用性重視の装置を設計製作し、機械要素について実験検証を行った。

2. 実験

2.1 工業計測による加工物の評価

2.1.1 X線による生栗の内部観察

図3にX線CT (TESCO社TXS320-ACTIS) による生栗の測定例を示す。鬼皮の厚みは均一ではなく、外観からは識別できないが極端に厚い部分がある。また、鬼皮と渋皮が密着している部位やmmオーダーの隙間が局所的にあり、これらを外観から判断することができない。

2.1.2 生栗の鬼皮の破壊挙動の計測

鬼皮を刃物で破壊するときの荷重-変位の挙動を評価するために、図4 (a) 左図に示すように万能試験機に木工用鉋刃を取り付けて測定を行った。同図右に示すように、栗の固定姿勢や方向を変更して負荷試験を実施したところ、図4(b)①～③に示すように、挙動の違いは3つのグループに大別できた。すなわち、①剛性が比較的高く、かつ破断の挙動が明確なもの、②小さな力で変形が進むもの、③上記二つの中間的挙動を示すもの、である。上記の①と②について、鬼皮が破壊した時の状況を図4 (c) に示す。

②の栗は鬼皮が裁断する前に内部の実が潰れている。この結果より、鬼皮だけを加工する場合は過剰な押し込みを防ぐために変位制御方式を用い、上記①のような剛性が高く明瞭な破断挙動を示す部位を対象とすることが最適と考えられる。

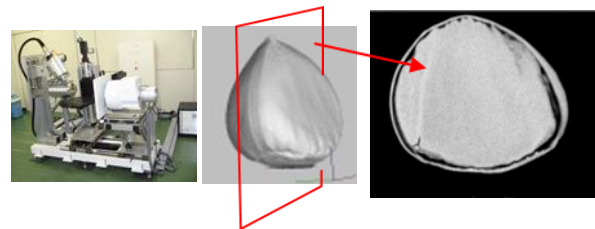
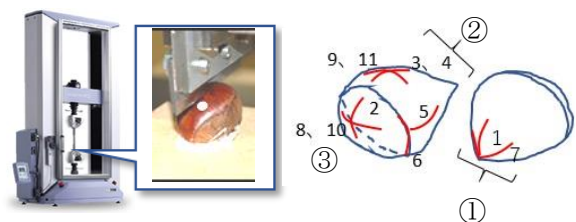
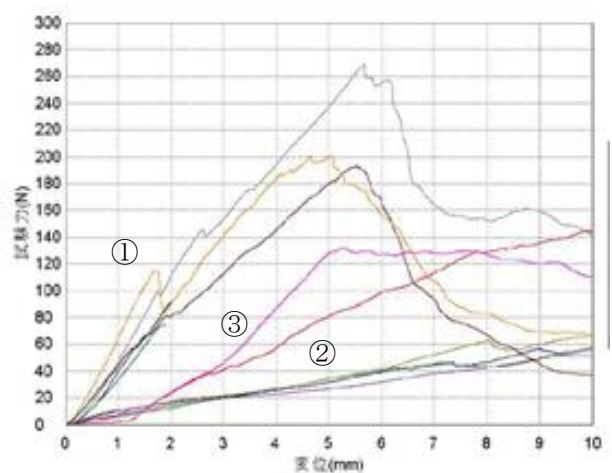


図3 X線CTによる内部構造の観察・測定



(a) 刃物との位置関係



(b) 荷重-変位曲線



(c) 鬼皮の破壊時の状況

図4 万能試験機による鬼皮の破壊挙動の調査

2.2 デジタル技術を用いたプロセスの検証

2.2.1 回転刃物式剥離プロセスの検証

大量の栗の皮を剥く装置は、一度にたくさんの栗を容器内に投入し、その底部に設置した刃物を回転させて皮を削り取る機構が一般的である。刃物の形状や栗への加圧⁴⁾、あるいは投入量により、加工量を調整しているものの安定した加工の実現は難しい。そこで、機構解析ソフト (Algoryx Simulation AB 社 Algoryx Momentum) を用いて、加工中の栗の挙動を調査した。投入する不定形の栗を再現するため、3D スキャナ (Carl Zeiss Optotechnik GmbH COMET6-16M) を用いて栗をデータ化し解析に用いた (図 5)。胴の高さ 100mm、刃物盤回転数 600rpm、刃物高さ 1mm とし、栗の充填量を 6、20、40 個の条件で 10 秒程度の挙動を解析している。図 6(a) (b) に解析における初期状態と、運転中のものをそれぞれ示す。少ない量では回転盤の動きで栗が上方に弾かれ、ほぼ常に飛び上がっている様子が見られる。このため、刃物に当たる確率が低いため、加工は進みにくいものと思われる。図 7 に 40 個投入した時の代表的な 3 つの栗の動き (刃物からの高さの変化) を示す。重心位置が代表値となるため 0.02m の位置が底付きした状態であり、さらに底にある栗が刃物に接触するのは低い確率となる。この図に示されるように刃物に当たる頻度・時間は一様でなく、長いもの短いものが存在する。前者は加工量過大となり、後者はほとんど加工されないことを意味する。また、上下の栗の入れ替わりが均一にできていない。これを検証するために、市販の円盤型砥石研磨機を改造し、刃物盤を取り付けて検証した (図 8)。個数が少ない場合は栗が弾き飛ばされ加工効率が悪く、多い場合は不均一な加工となり、機構解析の結果を裏付けるものとなった。

これらの結果から、効率の良い加工のためには、栗に刃物に押し付けるための力と、一様な加工時間が必要であるが、これらは投入量とトレードオフの関係であるうえ、栗が不定形であるために制御は困難である。



図 5 3D スキャナによる栗のデジタルデータ化

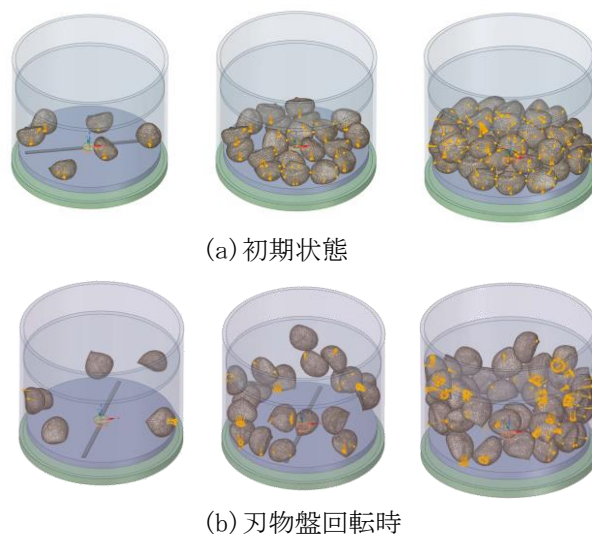


図 6 機構解析による容器内の栗の挙動

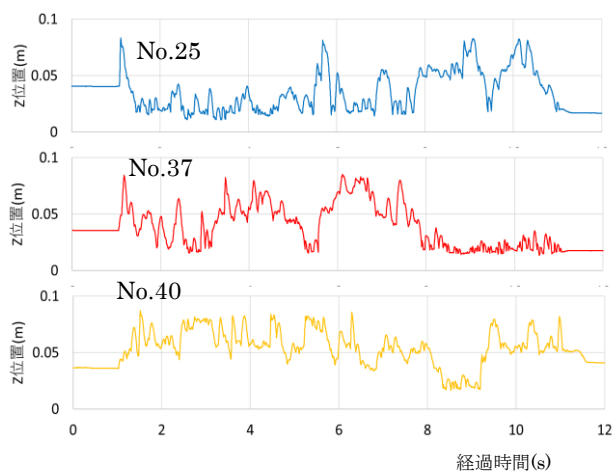


図 7 40 個投入した栗の中の 3 個の z 位置変化

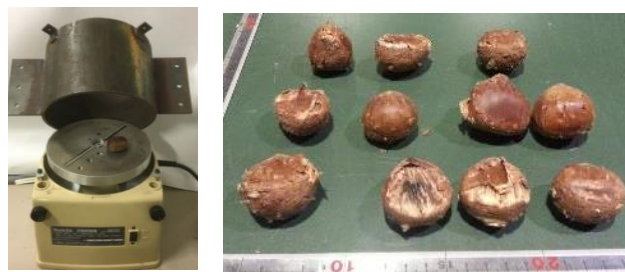


図 8 回転刃物式剥皮装置 (試作)

2.2.2 レーザー式鬼皮傷入プロセスの検証

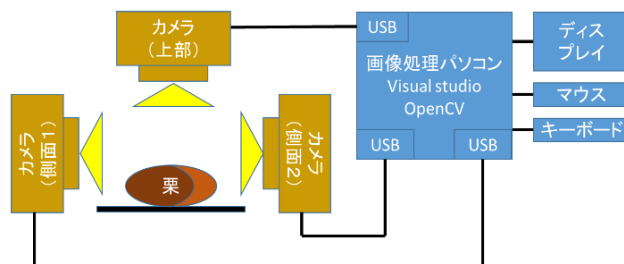
栗を1個ずつ剥皮加工する装置に、ぼろたん（良渋皮剥皮系ニホングリ品種）に特化したものではあるが、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構が開発したもの（樋野電気工業有限会社よりぼろたんカッターHS-201として市販）⁵⁾がある。これに倣い、コスト面で不利ではあるが鬼皮に傷入れを行うためにファイバーレーザー（JK Lasers 社 JK200FL）を用いて加工した事例を図9に示す。出力を可能な限り落とし、表面より離れた位置にデフォーカスさせたものの、渋皮に焦げ跡が生じたことから、レーザー走査中に焦点位置の厳密な制御が必要であることが判る。したがって、レーザーを含む多軸制御汎用加工機で加工するためには、不定形な栗の寸法形状データ取得が必須となる。



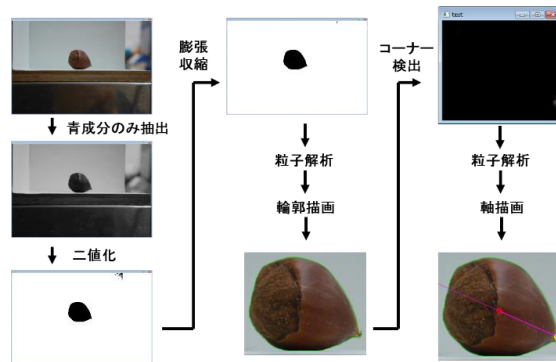
図9 レーザー加工機による鬼皮の傷入

2.2.3 画像処理による形状データの取得

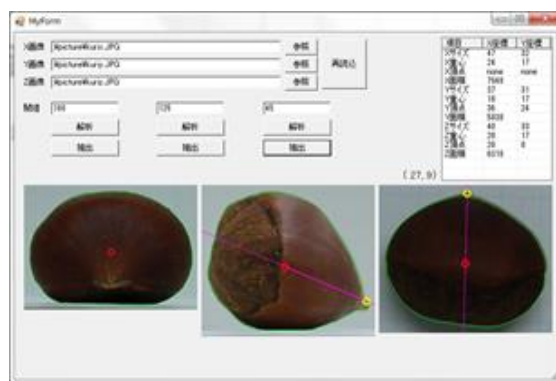
前述の傷入れ加工は、栗の輪郭形状のうち限定的な範囲を把握すればよい。そこで、高速に寸法形状を取得するために廉価な CCD カメラ（Logicool 社 C920r；画素数 1920×1080）と画像処理を用いた計測システムを試作した。システムの概略と画像処理フロー、測定事例の画面を図10(a)～(c)に示す。画像処理プログラムの開発環境には Microsoft 社 Visual Studio Community 2017、画像処理ライブラリには OpenCV3.4 を使用した。R、G、B 値のうち栗のコントラストが明瞭に得られた B 値が輪郭の抽出に適しており、これを2値化した。また、投射照明による栗の影は画像処理で除去することができないため、床面に白色光源（Moritex 社 MEW-5370LE）を設置している。ノイズを除去するために、粒子解析によって最大のものを栗として特定する。栗の姿勢を把握するため、Harris corner detector⁶⁾を用いることにより、先端を検出することができ、先端と画像重心を結んだ軸を求めることで方向を特定できる。なお、画像処理は検査工程でも利用することができ、栗の大小区分は果の長径⁷⁾で判断されることから、上面からの画像を用いて、軸の垂線を基準とした最大幅を求める方法も考えられる。



(a) 画像処理システム概略



(b) 画像処理フロー



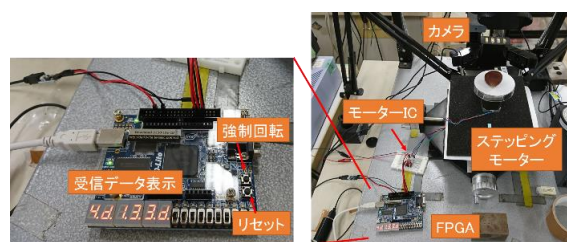
(c) 画像処理システムの画面

図10 栗の寸法形状を測定する画像処理システム

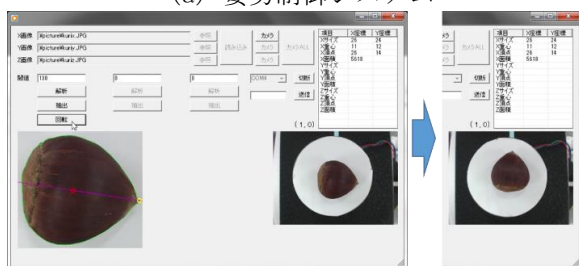
2.2.4 画像処理を組み込んだ加工準備プロセス

多軸加工機の利用において、加工対象の姿勢制御は加工効率の向上に資する。そこで、上記の画像処理によって得られたデータを用いて、栗の長径を任意の方向に向ける簡易的なシステムを、Field Programmable Gate Array(以下「FPGA」という)を用いて試作した(図11)。一般的にFPGAを利用する目的として、小ロットでも廉価であることと、外部からの読取困難性(リバースエンジニアリング防止)が挙げられる。図10(a)のシステムに、FPGA ボード(Terasic 社 DE10-Lite)とステッピングモーター(ST-42BYH1004)、モーターIC(TI 社 DRV8835)を加え、選択した向きに栗を回転させる姿勢制御を行った。なお、FPGA ボードにはインテル社 MAX10 が搭載されており、開発ソフトウェアにはインテル社 Quartus Prime 17.1 を使用した。図11(b)に無造作

に配置された栗を画像処理し、軸の傾きと突起の位置から画面中で上部を向くよう回転させた事例を示す。図中央はカメラの画像を逐次表示しており、同図右側の写真は動作完了後の画像である。栗は接地面が曲面で摩擦抵抗が少ないことから慣性力の影響で意図しない方向を向くことがあった。また、遠心力が作用するため回転速度の調整に制御が必要であった。このように、効率化のためには制御だけではなく、接地面の材質など物理的な条件にも工夫が必要である。



(a) 姿勢制御システム



(b) 姿勢制御実行画面

図 11 画像処理システムと FPGA による姿勢制御

2.3 実用的なプロセスの機械要素の開発

2.3.1 ユニークなプロセスの検討

これまでの結果から、鬼皮は加工工具を当てる位置や荷重によって破壊の難易度が変わること、不定形であるために破壊に必要な荷重や変位の値は一定ではないことが明らかとなっており、これらが加工あるいはハンドリングの難易度を上げていることがわかる。また、直線的な刃物（2.5次元加工）では、図12左側に示すように、曲面で構成する栗の可食部まで切除する。そこで、ゆで卵の殻剥きをヒントに、指で鬼皮の引裂きが容易にできるよう図12右下のように多数の穿孔（1次元加工）を施し、鬼皮のみ剛性（あるいは硬さ）を下げるとともに繊維等の連続性を断ち切る加工を目指した。穿孔加工ならば、渋皮に工具が到達しても傷が目立たず、渋皮付き生栗の製品としての品質には影響しない。さらに、鬼皮の穿孔位置はランダムでよいいため、精密なハンドリングや位置決めは不要となる。

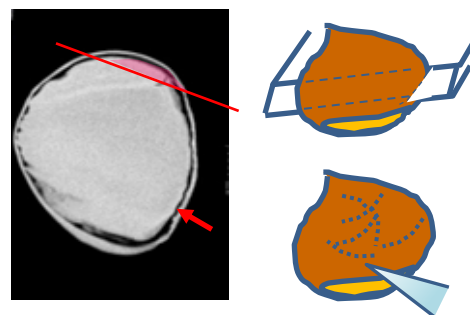


図 12 鬼皮の加工による可食部への影響

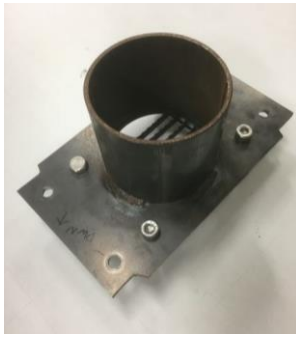
本研究では、想定される装置ユーザーの安全性や要求される処理能力（速度や量）、装置の信頼性とコストを勘案し、なるべく電子制御等に頼らず、機構が簡素な機械要素の開発を目指した。図4 (b) の①の荷重 - 変位曲線に見られるポップインが示すように、鬼皮の部分的な破壊に必要な荷重は同曲線の最大値よりも小さくて良く、その時の変位量も少ない。さらに、工具を振りぬく必要がないことから、工具は往復運動で加工を実現できる。この方式であれば、穿孔に必要な力は加速度と栗の自重で発生させることが可能であり、上に錘を載せることで自在に荷重を増やすことができる。

2.3.2 機械要素の試作と検証

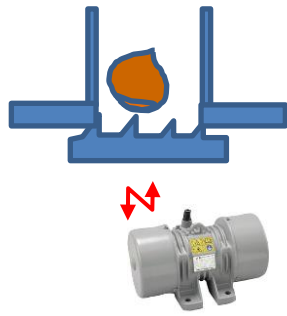
量産用機械の設計製作を見据えて、プロセスのスケールや補機類との接続などに融通性を持たせることを目的とするため、実験検証は中心となる機構の作用のみに絞った機械要素の検証を行う。

図13に試作した刃物付き容器の概略を示す。加振機構には振動モーターを利用し、ばねによる保持で8G (80m/s²) 程度の加速度が得られる。この加速度が容器本体にも付加されるため、振動により発生する応力に耐えられるよう剛性確保と慣性力低減の両立を目的に全体の大きさは小ぶりなものである。容器底に取り付けた穿孔用工具は、木工用の帯鋸を利用している。歯底（刃の間にある平面）の部分が栗の表面に接触することで、刃先が渋皮直前で止まる物理的なリミッターとして作用する。

図14(a)に、栗を充てんした状態の写真を示す。振動加速度8Gにおいて、栗の自重では穿孔ができないため錘が必要であった。また、複数個の栗を投入した場合、錘に当たらない栗は刃物への押し付け力が得られないため、剥皮できない加工ロスが発生する。図14(b)に穿孔後、手作業で鬼皮を剥離しているものを示す。穿孔された箇所は栗の先端側が多く、ここから鬼皮を割り進めることができる。



(a) 外観



(b) 動作概略

図 13 加振型穿孔用の刃物付き容器



(a) 容器に充填して状態



(b) 剥皮後

図 14 ランダム穿孔による鬼皮の加工

3. おわりに

本研究では、小規模な事業所の生産性や製品付加価値を向上させる加工装置の開発において、工業計測およびデジタル技術の適用、目的を絞った機械要素での実験といった手法および手順を実践したものである。

熊本県の特産品である栗を加工対象として選定し、高付加価値が得られる渋皮付き生栗を得るために、鬼皮の剥皮装置の機械要素開発を行った。不定形である生栗に工業的計測を適用することによって、形状以外に難加工となる要因を見出すことができた。また、CAEによる機構解析およびデジタル測定技術を用いた検証により、従来の加工における効率を阻害する因子を抽出することができた。これらの技術は現実を再現するものではなく、装置設計や改良の際

に気づきを与える重要な役割を果たすことが検証できた。これらによって、従来とは異なるアプローチの加工法のアイデアが導出することができた。加えて、これらの情報から機械要素を設計し、製作した実物を用いて検証することにより、安全性や保守性といった量産用機械装置が具備すべき性能について検討を行うことができた。デジタルとフィジカルが融合したこの一連の流れは、小ロットかつ廉価な機械装置の開発における一つの手法となると期待される。

本研究の取り組みは、令和元年度産業技術連携推進会議 九州・沖縄地域部会総会公設試研究者招待講演(令和元年9月27日)にて公表されています。また、県内企業で導入・活用を目的に技術普及講習会「Visual C#と画像処理入門」(平成31年3月7日)を開催し取り組み内容の一部を公表しています。

なお、本研究は競輪の補助を受けて導入した機器(島津製作所 オートグラフ;平成25年度導入)を用いました。



参考文献

- 1) H30年工業統計調査
- 2) sheetmetalましん&そふと, 2016年3月号, pp. 6-9
- 3) 農林水産統計, 平成30年くりの結果樹面積、収穫量及び出荷量(平成31年4月2日公表)
- 4) 多加充彦 古本達明 嶺蔭士朗、能登栗の皮むき省力化機器の開発、石川県工業試験場研究報告, Vol. 54、pp. 研究 02, 2006
- 5) 農林水産省 農林水産技術会議事務局 研究推進課, 新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業 研究紹介2011、pp. 8
- 6) Chris Harris and Mike Stephens, A combined corner and edge detector, In Proc. of Fourth Alvey Vision Conference, pp. 147-151, 1988
- 7) 農林水産省農産園芸局, 果実の全国標準規格, 1997

食品周辺産業支援に関する技術開発

－シルクパウダーの工業的用途創出に向けた取組み－

百田 寛*・甲斐 彰**・齋藤 幸雄*

* ものづくり室、** ものづくり室（現：技術交流企画室）

Technological Development for Support of Food-Related Industries

－ Approach for Industrial Applications of Silk Powder －

MOMOTA Hiroshi*, KAI Akira** and SAITO Sachio*

本研究は、2013年より熊本県が立ち上げたフードバレー構想の一環で実施したものである。熊本県産業技術センターでは、県産農産物であるシルクに着目し、その素材の強靱さと天然素材ならではの環境負荷の少なさを活かした、新たな用途創出に取組んだ。ここでは、シルク粉末-エポキシ樹脂複合材料を作製し、その引張強度を調査したところ、シルク粉末を樹脂に対して適切な割合で複合化した場合は、複合化しない樹脂のみと比較して3倍近くの強度を得ることができたため、樹脂の強化材として十分に機能することがわかった。現在、SDGsを背景として急激に需要が伸びている生分解性プラスチックをはじめとするバイオプラスチックに注目が集まっており、その強化材として十分応用が期待できるとともにシルク粉末の性状及び隠ぺい性の高さを考えると塗装の下地材など他の応用も考えられる。

1. はじめに

熊本県は、2013年3月に県南地域（八代地域、水俣・芦北地域、人吉・球磨地域）の食品・食品関連産業の活性化を図る目的で「くまもと県南フードバレー構想」を立ち上げた。その構想は、県南地域の豊富な農林水産物を活かし、6次産業化や農商工連携の促進により、地域内の農林水産物の高付加価値化を図るとともに、食品・バイオなどの研究開発機能や企業を集積させる「フードバレー」の形成を推進することで、県南地域の活性化を目指すために策定されたものである。

当センターでは、食品加工技術室を中心に県産農産物等の新たな用途開発や農業と食品産業及び食品周辺産業相互の連携を強化して地域産業の振興を目的とした研究を行った。ものづくり室においても、県産農産物の新しい用途開発として、天然素材であるシルクについて、その工業的用途に関する開発を実施した。

シルクは、蚕の繭から作られるものだが、本県においては、三四半世紀前まで広く養蚕が行われていた。しかし、第二次世界大戦後に化学繊維の急速な普及によって、絹繊維の需要が激減し、養蚕は急激に衰退してしまった。ところが、昨今の健康や美容ブームの影響もあってか、良質なタンパク源として、無菌環境で産出された繭を原料としたサプリメント

としての利用や保湿効果を期待した化粧品への配合等の新しい用途が続々と開発され、注目が集まっている素材である。一方、工業的な用途に目を向けてみると現在実用化されているものは、筆者が調べた範囲にはない。しかしながら、世界的な潮流であるSDGsを背景として、世界各国が従来型の生産・消費・廃棄からの脱却を図っている中、生分解性であるシルクの工業材料としての可能性を調査する意義は大きいと考える。これまで他の研究グループにおいて、PP樹脂の強化材としてシルク繊維やシルクの織物を用いて複合化した例が報告されている^{1)~3)}。

本研究では、作業性や保管性を重視し、さらに安定的な品質管理が行いやすいプロセスを想定して、シルクを粉末化することを目的にしている。また、その粉末を用いて、シルク粉末-樹脂複合材料を作製し、その機械的特性の調査を実施した。

2. シルク粉末について

2.1 シルクの一般的特性について

天然由来の繊維は数多くあるが、複合材料における強化材として利用されたり、検討されたものは、麻や綿で代表される植物由来のセルロース系繊維である。シルクやウールのような動物由来のタンパク質系繊維を対象とした研究は非常に数少ない。これは、セルロース系繊維に対してタンパク質系繊維が

劣っているということではなく、図1²⁾に示すようにシルク繊維の強度は、セルロース系繊維と比較して同等か若干低めではあるが、非常に伸びが大きく柔軟性に富んだ材料であり、複合材料化した際もセルロース系繊維では得られない特性が発現する可能性を有している。

またシルクの構造は、図2に示すように2本のフィブロインとその周りを薄く覆っているセリシンより成る³⁾。セリシンはアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、チロシンといった親水性のアミノ酸残基で大部分占められており⁴⁾、フィブロインはグリシンやアラニンといった疎水性のアミノ酸残基を多く含む。さらにセリシンは多層構造となっており、内外層で異なる性質を持っている。現在、セルロース系繊維を強化材とした熱可塑性プラスチックが実用化されているが、マトリクス材は疎水性であるが繊維は親水性のため、そのままの状態では密着性が悪いという問題を抱えている⁵⁾。そのため、シルクの特異な構造により、マトリクス材との密着性や含浸性についてセルロース系繊維とは異なる性質を示すものと期待される。

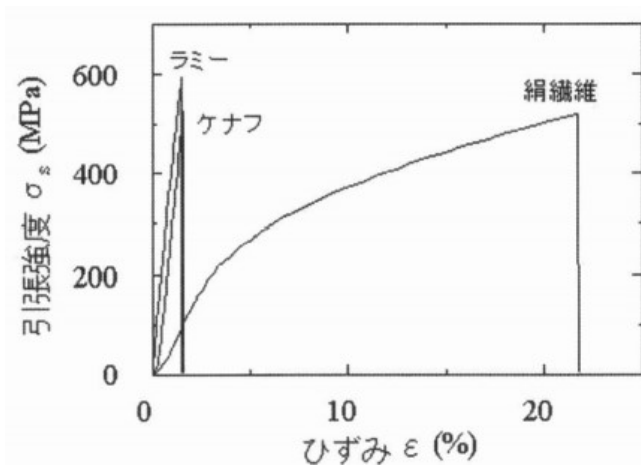


図1 各種繊維の引張試験結果

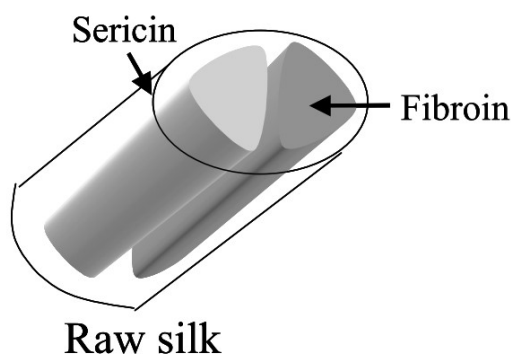


図2 シルク繊維の構造

2.2 形状及び外観

天然繊維を用いたマトリクス材の強化法として、長繊維を一方向に配列して方向性を持たせて強化する方法、あるいは本取組みのように短繊維をランダムに配置して等方的に強化する方法^{6) 7)}、さら繊維を用いて織物を作製し、その織物とマトリクス材を複合化させたテキスタイルコンポジット⁸⁾による強化法についても報告されている。前述したとおり本研究では、作業性、保管性及び品質の安定性を考慮し、図3に示すようにシルク繊維が100 μm以下の短繊維になるように粉末化したものを強化材として用いている。また繊維の剛性を保つために精練前の生糸に対して粉末化を行った。

図4に短繊維化したシルク粉末の反射率 (SCI方式) を示す。目視では、粉末は白色に見えるが、正反射を含んだ反射率が低波長側が落ち込んでいることにより、素材自体の色味としては僅かに黄色味がかっているとわかる。

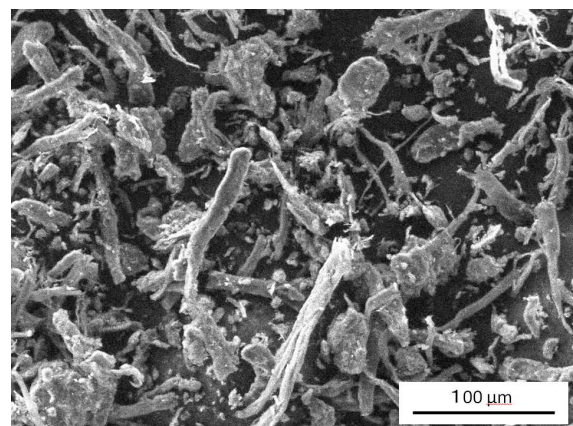


図3 シルク繊維の走査型電子顕微鏡写真

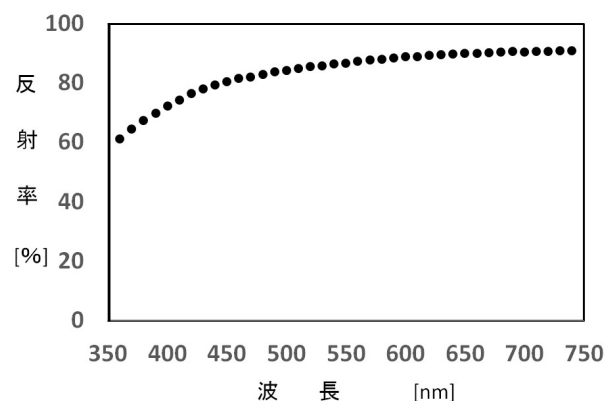


図4 シルク粉末の外観とその反射率 (SCI方式)

3. シルク粉末-樹脂複合材料について

シルク粉末-樹脂複合材料の作製方法について以下に示す。まず図5に示すJIS K7127に準拠した試験片形状(タイプ1B)の雌型を作製した。次にマトリクス材となる透明度の高いエポキシ樹脂(ストルアス社製エポフィックス)にシルク粉末を混合し、十分に攪拌の後、真空脱泡処理したものを雌型に流し込むことによって成形を行った。ここで、シルク粉末の樹脂に対する混合比率は、重量換算で10%, 20%, 40%とシルク粉末が含有していないものを含めて4種類を準備した。それぞれの成形体について引張試験に影響を及ぼすような気泡や内部亀裂等の欠陥がないかマイクロフォーカスX線CTを用いて検査を行い、上記のような欠陥がないことを確認した。

作製したシルク粉末-樹脂複合材料の外観と片持ち状態にした際の写真を図6に示す。シルク粉末の混合比率が増につれて黄色味が濃くなっており、このことは図4に示したシルク素材自体の色味を反映しているものと推察される。また片持ち状態の写真では、シルク混合比率が未混合から20%までは、混合比率が高くなるほど複合材料の撓み量が減少していることから、剛性の向上がみられる。混合比率が40%のものについては、撓み量が大きくなり、剛性が低下していることがわかる。このことについては、マトリクス材として用いたエポキシ樹脂は2液硬化型であるが、その樹脂に対してシルク粉末が過多であったため、液の流動性が低下し、十分に2液の混合が行えず、樹脂が十分硬化できなかった可能性が高いと推察している。

次に、実施したシルク粉末-樹脂複合材料の引張試験結果を図7に示す。シルク粉末が未混合のものは、8MPaの引張強度であったのに対して、混合比率10%、20%、40%のものは引張強度がそれぞれ17MPa、21MPa、8MPaであり、未配合のものと比較して混合比率10%のもので2.1倍、混合比率20%のもので2.7倍の引張強度を得た。混合比率40%のものについては、未混合のものと同等の引張強度であり、さらに伸びについては半分にも満たないという結果であったが、これらのことは前述したエポキシ樹脂の硬化不足が要因でないと思われる。したがって、樹脂に対して適切な混合比率で複合材料化する必要があるが、適切な混合比率であれば、シルク粉末が未混合のエポキシ樹脂と比較して、3倍近くの引張強度を有し、かつ高い剛性を発現できることがわかった。

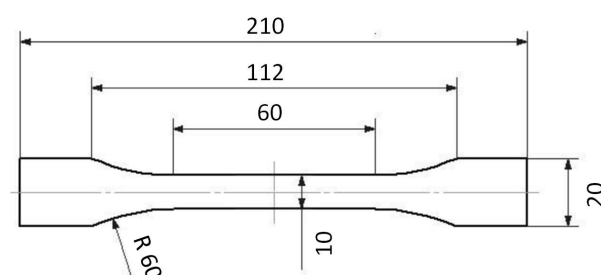


図5 成形した引張試験片の形状

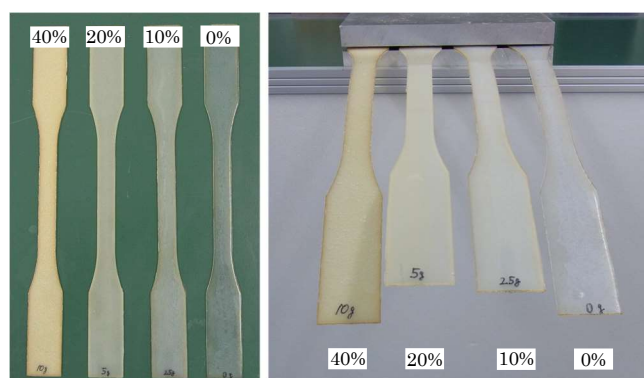


図6 シルク粉末-樹脂複合材料の外観(左)及び片持ち状態時の写真(右)

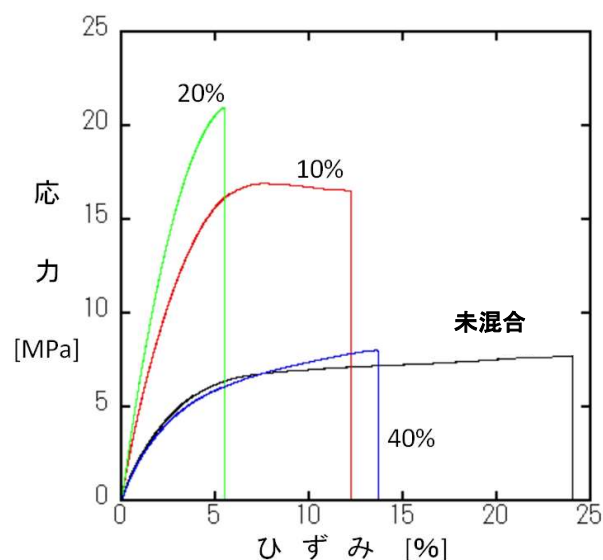


図7 シルク粉末-樹脂複合材料の引張試験結果

4. 総括

作製したシルク粉末-樹脂複合材料における引張試験結果から、粉末化したシルクが強化材となり、シルク粉末が未混合の樹脂単体と比較して最大2.7倍の引張強度を得ることができた。現在、樹脂の強化材として最も一般的に用いられているガラス繊維

強化プラスチックは、ガラス繊維の融点が高いために焼却の際に炉を傷めてしまうという問題がある。そのため、今回の結果は、シルク粉末-樹脂複合材料の新たな工業的用途の可能性を示すことができた。特に、生分解性プラスチックをはじめとしたバイオプラスチックをマトリクスとした複合材料化については、リサイクルをはじめとするプラスチックの資源循環システムとの調和性が非常に高いために、今後大きく用途拡大が進むことが期待される。また、シルク粉末の性状と複合化した際の樹脂の隠ぺい性の高さに着目するならば、塗装の下地に用いるプライマーとしての活用も有用でないかと考える。さらに樹脂とシルク繊維の複合化の際、繊維を樹脂表面に出すことで、塗装作業における重要な品質問題のひとつである塗装剥がれに対し、この抑制を目的としたアンカー層を形成できる可能性もあり応用拡大が期待される。

参考文献

- 1) K. Shigetaka and T. Kimura, "Mechanical Properties of Injection Molded Silk Fiber/Polypropylene Composites", Journal of the Textile Machinery Society of Japan, Vol. 55, No.8 (2002)
- 2) 香取重尊, 木村照夫: 絹繊維を強化材とする熱可塑性複合材料の射出成形, 繊維機械学会誌, Vol. 56, No. 10, pp. 409-413 (2003)
- 3) T. Kimura, H. Ino, K. Hanada and S. Katori, "Effect of Sericin on Mechanical Behavior of Composite Material Reinforced by Silk Woven Fabric", Seikeikakou, Vol. 22, No. 5, pp. 251-258 (2010)
- 4) 伊藤武男: 絹糸の構造, 76 (1957), 千曲会出版部
- 5) K. Okubo, H. Takagi and K. Goda, "Green Composites' Research and Today's Progress", Journal of the Society of Materials Science, Japan, Vol. 55, No. 4, pp. 438-444 (2006)
- 6) H. Takagi and Y. Ichihara, "Effect of fiber length on mechanical properties of "green" composites using a starch-based resin and short bamboo fiber", JSME International Journal Series A, Vol. 47, pp. 551-555 (2004)
- 7) M. Kitagawa and A. Kai, "Observation of crack growth in PMMA with a low short glass fibre content by optical interferometry", Journal of Material Science, Vol. 33, pp. 4569-4579 (1998)
- 8) R. Nakamura, H. Nomura, K. Goda, J. Noda and J. Ohgi, "Effects of Fabric Density and Yarn Twist on Mechanical Properties of Textile Green Composites", Journal of the Society of Materials Science, Japan, Vol. 58, No. 5, pp. 382-388 (2009)



Totally-organic near-infrared shielding materials by conductive cellulose nanofibers

K. Yoshida^{a,c}, S. Nagaoka^{a,b,c,*}, M. Horikawa^{a,c}, H. Noguchi^b, H. Ihara^{b,c}

^a Kumamoto Industrial Research Institute, 3-11-38 Higashi machi, Higashi-ku, Kumamoto 862-0901, Japan

^b Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto 860-8555, Japan

^c Kumamoto Institute for Photo-Electro Organics (PHOENICS), Higashi-ku, Higashi machi 3-11-38, Kumamoto 862-0901, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Shielding materials
Cellulose nanofiber
Cellulose sulfate
Conductive polymer
Near-infrared shielding
Double-paned glass
Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)
Coating

ABSTRACT

We synthesized poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) thin films by using a microcrystalline sulfated cellulose nanofiber (s-CNF) dopant. Specifically, we examined the ratio of EDOT monomer and CNF dopant, the quantity of initiator for the monomer, and the pH during polymerization. By doing so, we produced a PEDOT/s-CNF thin film with a conductivity that is 700 times higher than commercial simple PEDOT/polystyrene sulfonate (PSS) without adding agent. The optical adsorption of PEDOT/s-CNF thin film in the near-infrared (NIR) range (700–2000 nm) increased in accordance with the electrical conductivity increased. We estimated the visible light (380–700 nm) and NIR (700–2000 nm) transmittance τ by multiplying the spectral transmittance $\tau(\lambda)$ and weighting coefficients ($E_{\lambda} \Delta\lambda$), and taking the weighted average. Although the τ_{vis} of the optimized PEDOT/s-CNF thin film with the highest conductivity remained at 85.0%, the τ_{NIR} decreased to 69.8%. We dispersed the optimized PEDOT/s-CNF in the polyvinyl alcohol aqueous solution and coated the polymer onto a glass plate to provide NIR shielding. By testing the PEDOT-coated glass by irradiation with simulated sunlight, we confirmed that the film suppressed the temperature rise.

1. Introduction

Near-infrared (NIR; 700–2000 nm) light accounts for half of the energy in solar radiation [1]. NIR irradiation increases the temperature inside cars, buildings, and other structures, such that they consume more energy for air conditioning. However, increases in energy consumption contribute to global climate change. Thus, to suppress such temperature increases, researchers must develop materials and techniques that shield structures from NIR light.

Various materials have been reported to show NIR-shielding properties, including 1) metal oxides (NIR absorbing) such as tin-doped indium oxide (ITO) [2–4], antimony-doped tin oxide (ATO) [2,5], and cesium tungsten oxide (Cs_2WO_4) [6,7]; and 2) metals (NIR reflective) such as Ni, Ag, and Au [2,8–10]. In particular, thin films of ATO, ITO, and Cs_2WO_4 have attracted much attention because they show both high transmittance in the visible light range as well as high NIR optical absorption [2–4,7]. However, the uses of ATO is limited because antimony is harmful to the human body [11,12]. Indium and cesium are problematic because they are rare metals. Supply is limited because these metals are in high demand for them as raw materials to produce transparent electrodes and terminals of liquid-crystal displays, solar

panels, organic light-emitting diodes, and touch panels. Additionally, thin films of these inorganic materials are rigid and inflexible, limiting their applications [13]. Researchers have recently used conductive polymers for NIR shielding [14–16]. Among these polymers, poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) is a totally organic material that absorbs NIR light [14,15], and has been most attractive for use in solar cells, LEDs, and thermoelectric devices [17–21]. PEDOT thin films are simpler and cheaper to form than inorganic thin films because one can prepare the former at atmospheric pressure. An additional advantage is that the polaron and bipolaron of PEDOT have NIR optical absorption bands [22,23], and enhance the electric conductivity of PEDOT. In other words, one can increase the NIR optical absorption of PEDOT in accordance with the conductivity [24,25]. PEDOT is generally doped with polystyrene sulfonate (PSS). Recently, researchers increased the conductivity of PEDOT/PSS films by adding polar organic compounds to the PEDOT/PSS aqueous dispersion [26,27], and by exposing the PEDOT/PSS film to water vapor [28]. A chain transformation from the benzoid to quinoid structure occurs when a polar organic compound promotes PEDOT crystallization [26,27]. In the present paper, we used sulfated cellulose as a dopant for the following reasons: 1) it has hydroxyl groups in glucopyranose residues; 2) it has linear rigid chains

* Corresponding author.

E-mail address: nagaoka@kmt-iri.go.jp (S. Nagaoka).

<https://doi.org/10.1016/j.tsf.2020.138221>

Received 28 February 2020; Received in revised form 5 June 2020; Accepted 6 July 2020

Available online 09 July 2020

0040-6090/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

composed of β (1g4)-linked glucopyranose residues; 3) PEDOT molecules align around the rigid linear chains of cellulose; and 4) one can readily incorporate sulfated groups into cellulose can be easily controlled by using chlorosulfonic acid. Furthermore, the crystallinity of the cellulose structure influences the conductivity of PEDOT. Doping PEDOT with microcrystalline cellulose sulfate increases its conductivity more than doping with amorphous cellulose sulfate [29].

Previously, we used cellulose sulfated from bulk cellulose (pulp) as a dopant [29]. However, this pulp often sulfated inhomogeneously. In the present study we used a cellulose nanofiber, with a homogeneous microstructure, as the starting material. To produce a PEDOT thin film with higher conductivity than what has been previously reported in the literature, we optimized the redox polymerization of EDOT by using sulfated cellulose nanofiber (s-CNF). We also investigated the optical properties of the obtained PEDOT thin films. We coated the optimized PEDOT/s-CNF was coated onto a glass plate, and examined its NIR-shielding properties by irradiating the thin film with simulated sunlight. We also assessed the mechanical properties derived from using CNF as the inner thin film of the NIR-shielding material. Moreover, we coated PEDOT/s-CNF onto polyethylene terephthalate (PET) film by the roll-to-roll gravure and fabricated an inner thin film between two glass plates.

2. Experimental

2.1. Materials

We used CNF (nanoforest-S BB-C, high defibration degree, made from bamboo; Chuetsu Pulp & Paper Co., Ltd., Japan) as the starting material. The freeze-dried CNF was pulverized with milling equipment. We used 3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT; Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan) as the monomer for preparing PEDOT. Iron(III) sulfate n-hydrate (Wako Chemicals Co. Ltd, Tokyo, Japan) was used as a redox reagent. We used potassium persulfate ($K_2S_2O_8$; Nacalai Tesque, Inc., Japan) as a radical initiator. The CNF was sulfated using chlorosulfonic acid (Sigma-Aldrich Japan Co., LLC, Japan). We purified s-CNF and PEDOT/s-CNF by dialysis using molecular-scale porous membrane tubing with a cut-off molecular weight of 3500 (Spectra/por3, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). Polyvinyl alcohol-butene diol copolymer (PVA; Mitsubishi Chemical Corp., Japan) was used as the matrix polymer for the inner thin film. We used PEDOT/PSS (conductive grade PEDOT/PSS, from the commercial product catalog, Sigma-Aldrich Japan Co. LLC) as a reference conductive polymer.

2.2. Preparation of sulfated CNF

We synthesized s-CNF using chlorosulfonic and CNF (Scheme 1). Two grams of CNF was suspended in 200 mL of *N,N*-dimethylformamide (DMF) while stirring for 24 h. After dispersing the suspension with an ultrasonic probe for 2 min, we added 3.6 mL of chlorosulfonic acid dropwise over the course of 30 min at 10 °C, and then stirred for 6 h. The crude product was re-precipitated using a saturated sodium acetate–ethanol solution (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan), then the precipitate was washed repeatedly with a 13.4 vol% methanol / 85.5 vol% ethanol / 1.1 vol% propanol mixture (Solmix AP-1, Japan Alcohol Trading Co., Ltd., Tokyo, Japan) until the pH of the supernatant solution was 7.0. We dispersed the precipitate in water and purified the solution by dialysis for 72 h. The obtained products were freeze-dried.

2.3. Preparation of PEDOT

Scheme 2 shows the redox polymerization of EDOT using s-CNF and the redox reagent. We optimized the redox polymerization of PEDOT by using sulfated cellulose nanofiber (s-CNF). Table 1 summarizes the polymerization conditions of EDOT. We prepared PEDOT/s-CNF by

oxidative polymerization of EDOT in an aqueous dispersion of s-CNF. Concentrated hydrochloric acid was added to 25 mL of a 0.2 wt.% aqueous dispersion of s-CNF to attain a specific pH value. We added EDOT to the s-CNF aqueous dispersion and suspended it by sonication with an ultrasonic probe for 1 min. Then, a specific amount of $K_2S_2O_8$, used as the radical initiator, was added to the aqueous dispersion with a specific amount of iron(III) sulfate n-hydrate [$Fe_2(SO_4)_3$], the redox reagent; this solution was stirred at 25 °C for 1 d. We purified the crude products were purified by dialysis for 72 h. Then, the concentration of the aqueous dispersion was increased to 0.6 wt.% by evaporation. To evaluate their electrical conductivity, we prepared PEDOT/s-CNF thin films on glass substrates by spin-coating, using the PEDOT/s-CNF aqueous dispersion, as reported previously [29].

2.4. Fabrication of PEDOT/s-CNF–PVA composite films

We homogeneously mixed 5 g of 1.2 wt.% PEDOT/s-CNF aqueous dispersion and 25 g of aqueous solution containing 3.0 g of PVA. The PEDOT/s-CNF PVA aqueous dispersion was stirred and sonicated with an ultrasonic probe for 1 min. We added of 0.06 g of Triton X (The Dow Chemical Company Japan, Tokyo, Japan) as a surfactant. The glass substrate, treated by UV–ozone cleaning, was coated with 5 mL of the PEDOT/s-CNF PVA aqueous dispersion using a doctor blade. We dried the glass substrate coated with the PEDOT/s-CNF–PVA composite film under heated air.

2.5. Instrumental

We measured the electrical surface resistance with a resistance meter (Loresta-GP or Hiresta-UP, Mitsubishi Chemical Analytech Co. Ltd., Tokyo, Japan) using the four-terminal method. UV–visible (UV–vis) and NIR spectra were measured using a UV–vis absorption spectrometer (V-670, JASCO Corp., Tokyo, Japan). We estimated the degree of substitution (DS) of the sulfate groups in the sulfated CNF from the sulfur content using Eq. (1), measured by elemental analysis (vario MICRO cube, Elementar Analysensysteme, Frankfurt, Germany):

$$DS = \frac{S(\%)/32.07}{C(\%)/12.01/6} \quad (1)$$

S(%): elemental analysis value of sulfur; and C(%): elemental analysis value of carbon.

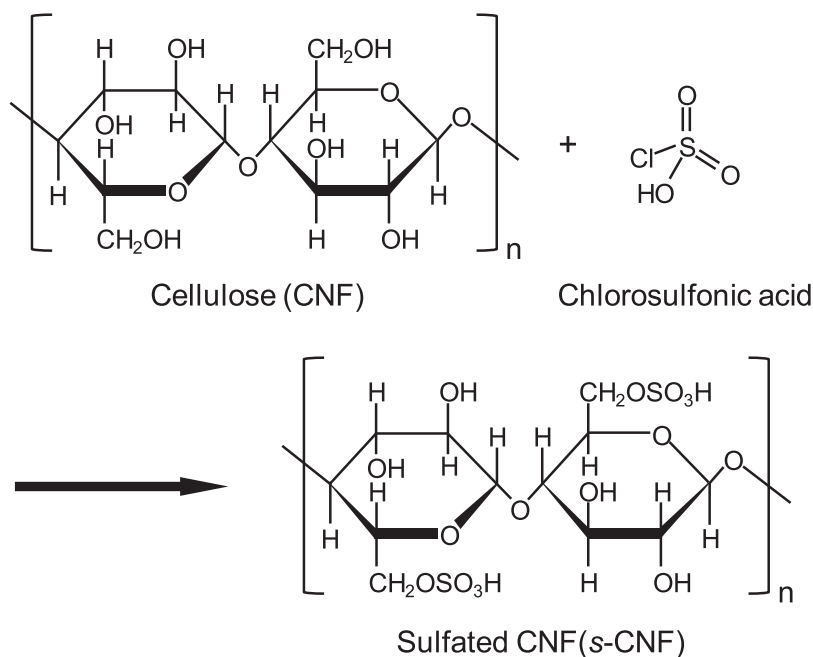
We performed dispersion with an ultrasonic instrument (Sonifier SFX250, Branson Ultrasonics, Emerson Japan, Ltd). The thickness of the PEDOT thin films was measured with a stylus profilometer (Dektak-150, Bruker Corp, Tucson, AZ, USA). We evaluated the light-shielding properties by examining the suppression of the temperature rise inside an apparatus irradiated with simulated sunlight (SERIC Ltd, Tokyo, Japan). A data logger (T&D Corporation, Nagano, Japan) monitored the temperature inside the apparatus. The simulated sunlight was restricted to a wavelength range of 400–690 nm by a cut filter (Edmund Optics Ltd., York, UK.). We observed the morphology of the PEDOT/s-CNF film using transmission electron microscopy (TEM; JCM-5700, JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of polymerization

As reported previously, the electrical conductivity of PEDOT/s-CNF was highest when the s-CNF had a homogeneous microcrystalline structure [29]. We chose s-CNF (DS: 1.73) with a microcrystalline structure from various types of s-CNF. A high polymerization degree, doping level, conjugation length, and crystallinity can enhance the conductivity of PEDOT chains [25].

In the present study, we optimized the redox polymerization for EDOT to obtain PEDOT that exhibits with higher electrical conductivity



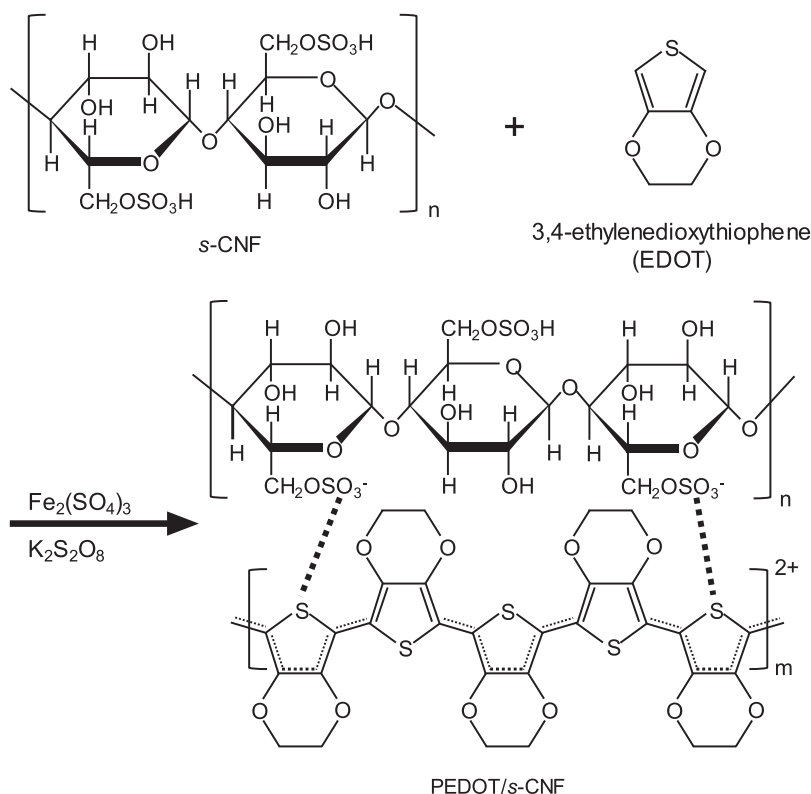
Scheme 1. Synthesis of sulfated CNF (s-CNF).

than previously reported. It is considered that the electrical conductivity property of obtained PEDOT thin films was influenced by the molar ratio of EDOT to s-CNF, a concentration of reagent as the redox polymerization initiator and pH in polymerization. Table 1 summarizes the preparation condition of PEDOT/s-CNF. For comparison, we used a simple commercial PEDOT/PSS thin film.

First, we examined the molar ratio of EDOT to s-CNF in polymerization. The PEDOT thin film prepared with a 4:1 molar ratio of EDOT to s-CNF showed the highest conductivity (Fig. 1a). This result

suggests that for the PEDOT to have high conductivity, it must be prepared with an optimum quantity of EDOT. If there is too much EDOT, the quantity of PEDOT that does not interact with the sulfate ion on the s-CNF increases, thus increasing the proportion of the benzoid structure in the PEDOT.

Next, fixing the molar ratio between EDOT and s-CNF to 4:1, we examined the optimum amount of redox polymerization initiator, $K_2S_2O_8$, added to the EDOT. The initiator concentration influenced the EDOT (Fig. 1b). We maximized the electrical conductivity of the PEDOT



Scheme 2. Synthesis of PEDOT/s-CNF.

Table 1

Preparation condition of PEDOT/s-CNF.

PEDOT Sample No.	Molar ratio s-CNF	EDOT	K ₂ S ₂ O ₈ (mol x 10 ⁻⁴)	Fe ₂ (SO ₄) ₃ ¹⁾ (μL)	pH
1	1.0	0.125	3.5	250	1.0
2	1.0	0.250	3.5	250	1.0
3	1.0	0.500	3.5	250	1.0
4	1.0	1.0	3.5	250	1.0
5	1.0	2.0	3.5	250	1.0
6	1.0	4.0	3.5	250	1.0
7	1.0	8.0	3.5	250	1.0
8	1.0	4.0	7.0	500	1.0
9	1.0	4.0	3.5	250	1.0
10	1.0	4.0	1.8	125	1.0
11	1.0	4.0	0.9	62.5	1.0
12	1.0	4.0	0.4	31.3	1.0
13	1.0	4.0	1.8	125	0.89
14	1.0	4.0	1.8	125	1.24
15	1.0	4.0	1.8	125	1.43
16	1.0	4.0	1.8	125	1.60
17	1.0	4.0	1.8	125	1.84
18	1.0	4.0	1.8	125	1.86

¹⁾ Fe₂(SO₄)₃ aqueous solution (1.4 mg/mL).

thin film by using 23 mol% K₂S₂O₈.

In addition, at an EDOT to s-CNF molar ratio of 4:1 and 23 mol% of K₂S₂O₈ for EDOT, we polymerized EDOT at various pH values.

The electrical conductivity considerably increased in accordance with decreasing pH of polymerization (Fig. 1c). This suggests that the sodium ion remaining in the s-CNF influences the electrical conductivity. Sodium ions inhibit a conversion to the polaron or bipolaron structure in PEDOT [23]. In this study, we assumed that the sodium ions inhibited the interaction between PEDOT and OSO³⁻ in the s-CNF. Thus, to obtain a PEDOT thin film with high electrical conductivity, we believe that it was necessary to completely exclude the sodium ion from the nearby s-CNF by using a strong acid. The PEDOT/s-CNF thin film prepared at pH 0.89 had a conductivity that is 700 times higher than a commercial simple PEDOT/PSS thin film. The molar ratio of EDOT to s-CNF, and the redox polymerization initiator concentration, influenced the degree of polymerization. Additionally, the pH of polymerization influenced the conductivity. As a result, we obtained higher conductivity by optimizing the polymerization.

3.2. Optical properties of PEDOT/s-CNF film

Fig. 2 shows a TEM image of PEDOT/s-CNF (PEDOT No.13), indicating a microcrystalline structure of 200–300 nm in diameter. Fig. 3 shows the optical properties of the PEDOT prepared at various pH values, measured with UV-vis / NIR spectroscopy. Although all of the PEDOT/s-CNF thin films exhibited almost the same optical absorption in the visible light region (380–700 nm), their optical adsorption in the NIR region (700–2000 nm) increased in accordance with increasing electrical conductivity. These results suggest that the PEDOT converted to a bipolaron structure, as reported by Mochizuki et al. [23].

We determined the weighting coefficients ($E_{\lambda} \cdot \Delta\lambda$) are determined from the solar relative spectral distribution and wavelength interval. We denote the visible light (vis; 380–700 nm) transmittance and near-infrared (NIR; 700–2000 nm) transmittance as $\tau_{\text{vis}(380-700)}$ and $\tau_{\text{NIR}(700-2000)}$. We obtained the $\tau_{\text{vis}(380-700)}$ by measuring the spectral transmittance $\tau(\lambda)$ from 380 to 700 nm, and by using Eq. (2), which multiplies by the weighting coefficients ($E_{\lambda} \cdot \Delta\lambda$) and takes the weighted average. Similarly, we obtained the $\tau_{\text{NIR}(700-2000)}$ using Eq. (3):

$$\tau_{380-700} = \frac{\sum_{380}^{700} E_{\lambda} \cdot \Delta\lambda \cdot \tau(\lambda)}{\sum_{380}^{700} E_{\lambda} \cdot \Delta\lambda} \quad (2)$$

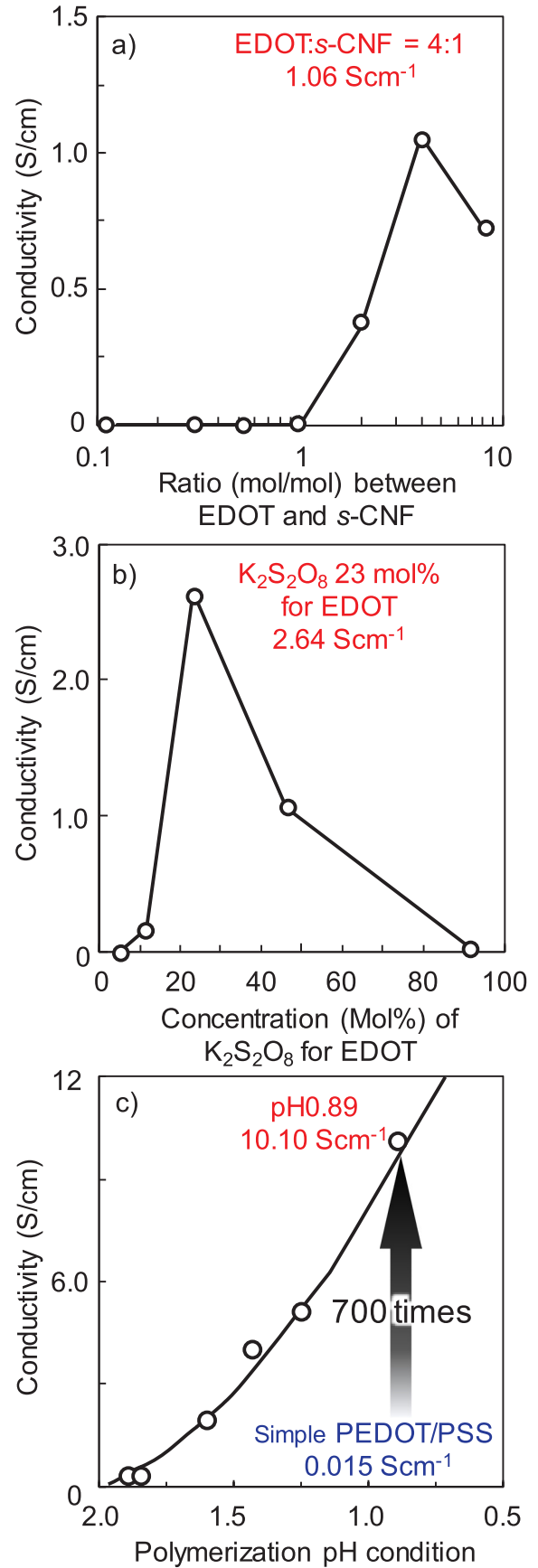


Fig. 1. Conductivity of PEDOT/s-CNF film prepared in various conditions. a) EDOT/s-CNF ratio condition, b) Concentration of K₂S₂O₈, c) pH condition.

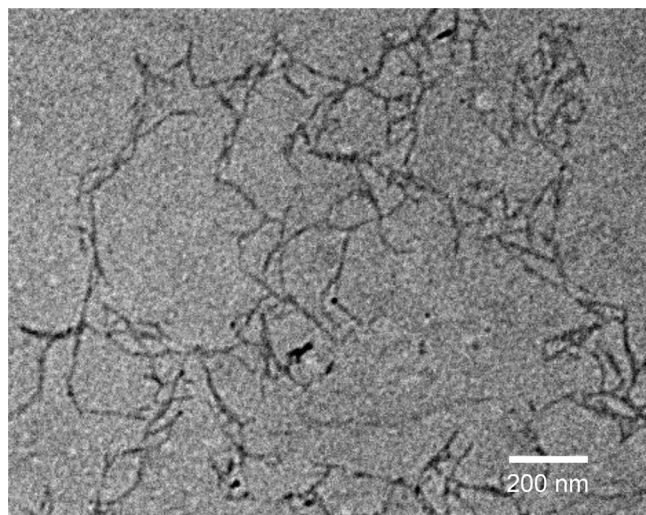


Fig. 2. TEM image of PEDOT/s-CNF prepared with an EDOT:s-CNF molar ratio of 4:1 and 23 mol% of $K_2S_2O_8$ for EDOT at pH0.89.

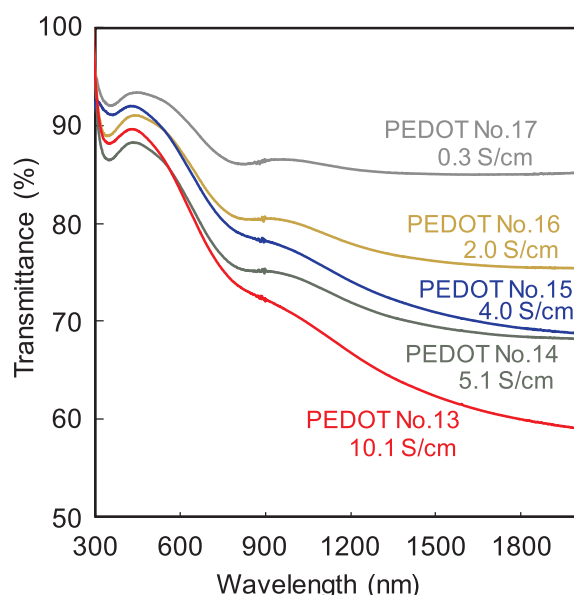


Fig. 3. Optical properties of the PEDOT/s-CNF with various conductivities.

$$\tau_{700-2000} = \frac{\sum_{700}^{2000} E_{\lambda} \cdot \Delta\lambda \cdot \tau(\lambda)}{\sum_{700}^{2000} E_{\lambda} \cdot \Delta\lambda} \quad (3)$$

E_{λ} : Solar relative spectral distribution

$\Delta\lambda$: Wavelength interval

JIS R 3106 [30] described the weighting coefficients.

Table 2 summarizes the $\tau_{\text{vis}(380-700)}$ and $\tau_{\text{NIR}(700-2000)}$ values against the conductivity values of the obtained PEDOT/s-CNF thin films. As the electrical conductivity increased, $\tau_{\text{NIR}(700-2000)}$ gradually decreased, although $\tau_{\text{vis}(380-700)}$ remained constant. The $\tau_{\text{vis}(380-700)}$ of the PEDOT/s-CNF thin film (PEDOT No. 13) with the highest conductivity was 85.0%, whereas the $\tau_{\text{NIR}(700-2000)}$ was 69.8%.

3.3. PEDOT/s-CNF-PVA composite film

We applied PEDOT/s-CNF thin films to NIR-shielding materials. Figure 4 shows that the composite film fabricated from the PEDOT/s-CNF dispersed in PVA aqueous solution was highly transparent.

Table 2

Vis and NIR transmittance ($\tau_{380-700}$ and $\tau_{700-2000}$) and conductivity of PEDOT/s-CNF thin films.

PEDOT No.	Conductivity (S cm^{-1})	Transmittance (%) at 550 nm	$\tau_{380-700}$ (%)	$\tau_{700-2000}$ (%)
13	10.1	92.4	85.0	69.8
14	5.1	89.3	88.3	76.4
15	4.0	86.0	84.9	73.7
16	2.0	89.3	88.3	79.4
17	0.3	86.2	91.6	86.0

Table 3 summarizes the tensile strength of a PEDOT/s-CNF-PVA composite film, compared with the PEDOT/PSS-PVA and PVA films. The PEDOT/s-CNF-PVA composite film was 1.4 times stronger than the PEDOT/PSS-PVA and PVA films. We hypothesize that this is attributable to the CNF reinforcement.

3.4. NIR shielding effect of PEDOT/s-CNF-PVA thin film

We also used the PEDOT/s-CNF films for light-shielding. We formed an 11mm-thick PEDOT/s-CNF-PVA thin film on a glass plate with an area of 150 × 150 mm (PEDOT/s-CNF-PVA coating glass plate). We monitored the temperature as follows: 1) we use a data logger used to monitor the temperature was placed inside an open-top box with an aperture area of 100 × 100 mm (box width × length × height = 180 × 180 × 250 mm, wall and bottom thickness of 18 mm) made from styrene resin; 2) we placed a cut filter (cut-off range of 400–690 nm) on the glass plate coated with PEDOT/s-CNF-PVA; 3) we monitored the temperature inside the apparatus for 30 min under irradiation with simulated sunlight, 53.8 klx illuminance. Fig. 5 shows the temperature rise monitoring results. For the PVA-coated glass, the temperature increased to 39.7 °C in 30 min. In contrast, for the glass coated with PEDOT/s-CNF-PVA, the temperature increased to only 36.9 °C in 30 min. Table 4 summarizes the temperature rise over 30 min.

Eq. (3) defines the suppression of the temperature rise:

$$\text{TSD} = \frac{(R_2 - R_1) - (T_2 - T_1)}{(R_2 - R_1)} \times 100 \quad (3)$$

TSD: Temperature rise suppression degree (%)

R_1 : Initial temperature, bare glass,

R_2 : Temperature after 30 min, bare glass.

T_1 : Initial temperature, glass coated with PVA or PEDOT/s-CNF-PVA

T_2 : Temperature after 30 min, glass coated with PVA glass PEDOT/s-CNF-PVA

The temperature in the case of bare glass increased to 40 °C. In contrast, for the glass coated with PEDOT / s-CNF-PVA, the temperature increased to only 36.9 °C. Thus, the temperature rise of the glass coated with PEDOT/s-CNF-PVA was suppressed by 3.1°C compared with uncoated glass. The PVA-coated glass exhibited a TSD of 0.67%, whereas that of the glass coated with PEDOT/s-CNF-PVA was 25.5%. Thus, PEDOT/s-CNF exhibited higher NIR optical adsorption (Table 4).

3.5. Fabrication of PEDOT/s-CNF-PVA composite film on a PET film

We scaled up the PEDOT/s-CNF dispersed in PVA aqueous solution to 13.5 kg, which we used to coat a large PET film. The solution viscosity and pH of the obtained solution were 285 mPa·s and 4.83, respectively. Using the roll-to-roll gravure, we coated PEDOT/s-CNF onto a PET film with a thickness of 50 μm and dimensions of 900 mm × 500 m, to use as an inner thin film between the double-

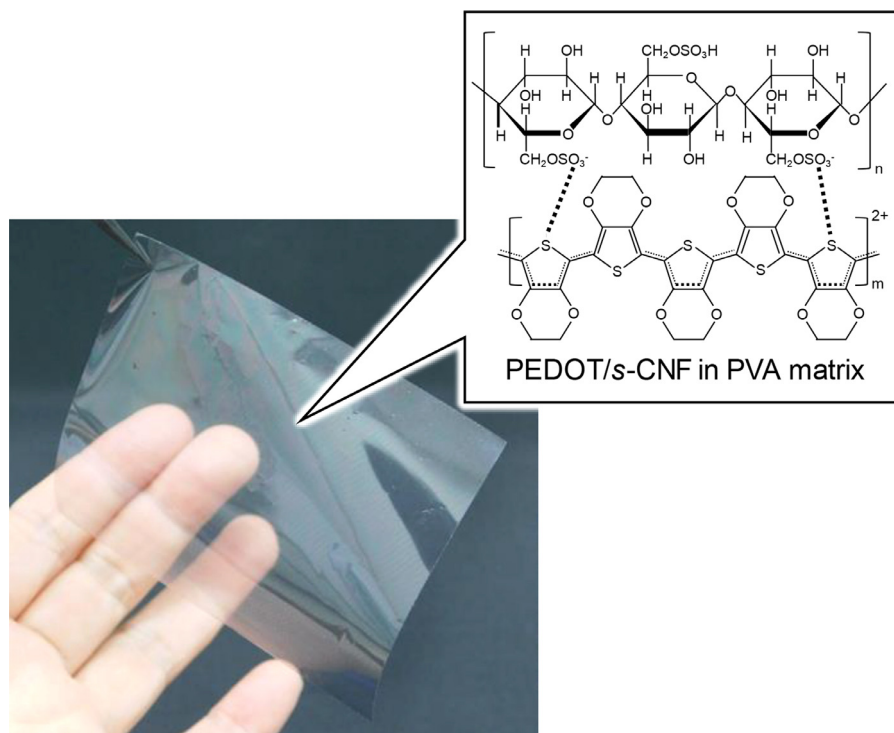


Fig. 4. PEDOT/s-CNF-PVA composite film.

Table 3

Preparation condition and tensile strength of PEDOT/S-CNF-PVA composite film.

Film	PEDOT Content (wt%)	PVA Content (wt%)	Thickness (mm)	Tensile strength (MPa)
PVA alone	0	100	40	22.4
PEDOT/PSS-PVA	2.0	98	40	22.7
PEDOT/SCNF-PVA	2.0	98	40	31.9

Table 4

Temperature rise suppression effect using PEDOT/s-CNF-PVA film.

Substrate	Initial Temp. (°C)	Temp. after 30 min (°C)	TSD (%) ¹⁾
Bare Glass ²⁾	25.1 (R ₁ Value)	40.0 (R ₂ Value)	–
PVA Glass ³⁾	24.9	39.7	0.67
PEDOT/s-CNF-PVA Glass ⁴⁾	25.8	36.9	25.5

¹⁾ TSD: Temperature rise suppression degree.²⁾ Bare Glass: Visible light cut filter + Glass.³⁾ PVA Glass: Visible light cut filter + Glass coated PVA.⁴⁾ PEDOT/s-CNF-PVA: Visible light cut filter + Glass coated PEDOT/s-CNF-PVA.

paned glasses. After coating, we dried the film in a chamber at 110 °C conveyed by a roll-to-roll process in Fig. 6. The obtained film was uniformly transparent, and its thickness was ca. 11 μm. We incorporated the film as an inner thin layer between double-paned glass, as can be seen in Fig. 7.

4. Conclusions

We performed redox polymerization of EDOT by using s-CNF, as follows: 1) We investigated the molar ratio of EDOT to s-CNF in the polymerization was investigated. The PEDOT/s-CNF exhibited the highest conductivity at a 4:1 molar ratio. 2) At this 4:1 molar ratio, we optimized the quantity of K₂S₂O₈, as a redox polymerization initiator, added to the EDOT. The PEDOT thin film exhibited a maximum electrical conductivity with the addition of 23 mol% K₂S₂O₈. 3) We

polymerized the EDOT at various pH values. The electrical conductivity of the PEDOT considerably increased in accordance with decreasing pH of polymerization. Overall, we produced a PEDOT/s-CNF thin film with a conductivity that was ca. 700 times higher than a simple PEDOT/PSS thin film. 4) The NIR optical adsorption of the PEDOT/s-CNF thin film also increased in accordance with increasing its electrical conductivity, although the optical adsorption in the UV-vis range remained constant. We estimated the visible (380–700 nm) and NIR (700–2000 nm) transmittance by using weighting coefficients ($E_{\lambda} \cdot D$) from the solar relative spectral distribution (E_{λ}) and wavelength interval ($\Delta\lambda$). Although the visible transmittance (380–700 nm) of the PEDOT/s-CNF thin film with the highest conductivity reached 85.0%, the NIR transmittance (700–2000 nm) decreased to 69.8%. 5) We used glass coated with PEDOT/s-CNF as a window for the sealed box and irradiated the box with NIR and infrared light. The PEDOT/s-CNF thin film suppressed the temperature increase, as measured by a TSD of 25.5%, demonstrating effective thermal insulation.

CRediT authorship contribution statement

K. Yoshida: Writing - original draft, Formal analysis, Investigation. **S. Nagaoka:** Conceptualization, Writing - review & editing, Investigation. **M. Horikawa:** Formal analysis, Investigation. **H. Noguchi:** Formal analysis, Investigation. **H. Ihara:** Supervision.

Declaration of Competing Interest

To the best of our knowledge, the named authors have no conflict of

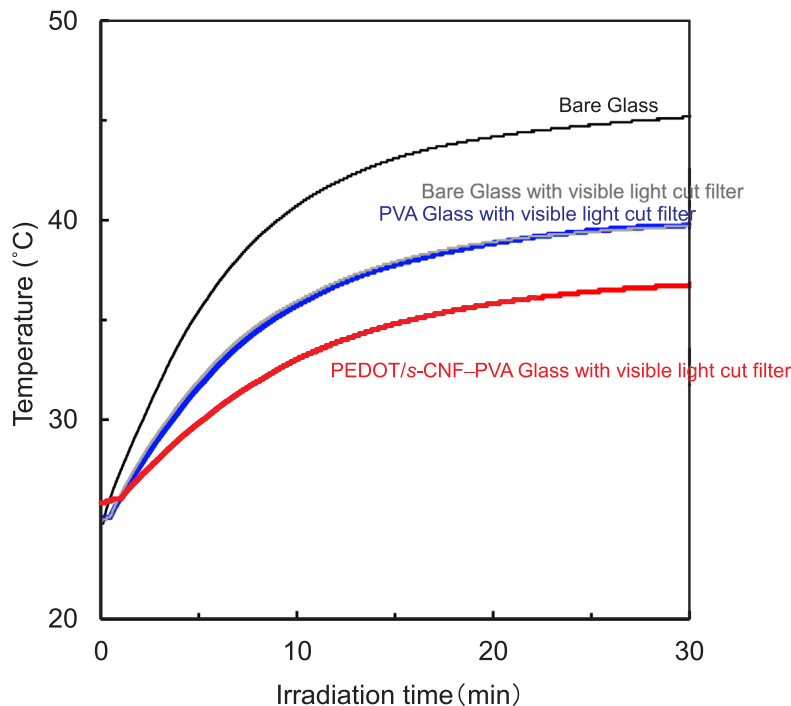


Fig. 5. Temperature rise monitoring using simulate sunlight.

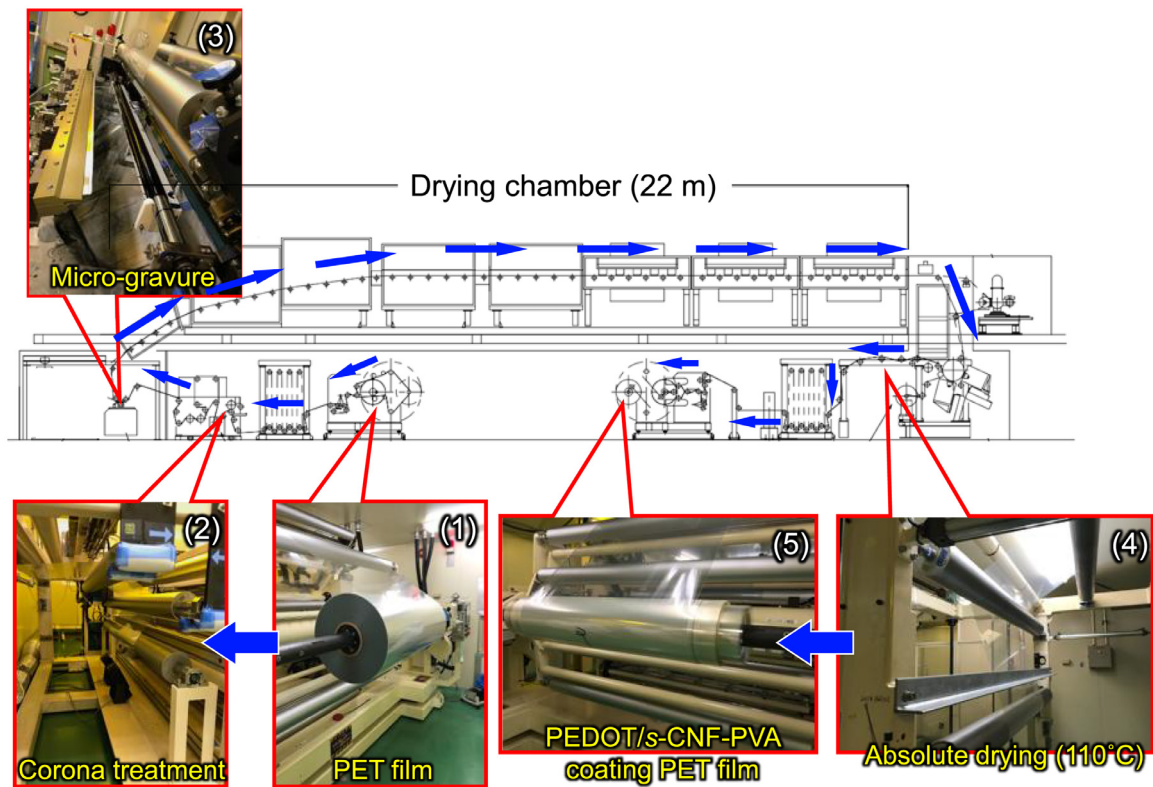


Fig. 6. Coating process of PEDOT/s-CNF-PVA on the PET film by roll-to-roll gravure process.

interest, financial or otherwise.

Acknowledgments

This work was supported by Grants in Ministry of the Environmental and JSPS KAKENHI Grant Number JP19K15158. The sponsors had no role in study design; in the collection, analysis, and

interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the article for publication. We thank Mr. Tsutomu Kawaguchi of Kumamoto Industrial Research Institute for their capable assistance; Mr. Hiroyuki Tanaka of Chuetsu Pulp & Paper Co., Ltd. for providing CNF; Mr. Norimi Takemura of Figma Co., Ltd. for the fabricating of double-paned glass; and Mr. Shuichi Iwanaga of LABO Co., Ltd. for roll-to-roll gravure coating. We thank Joshua Yearsley, MS, and Michael

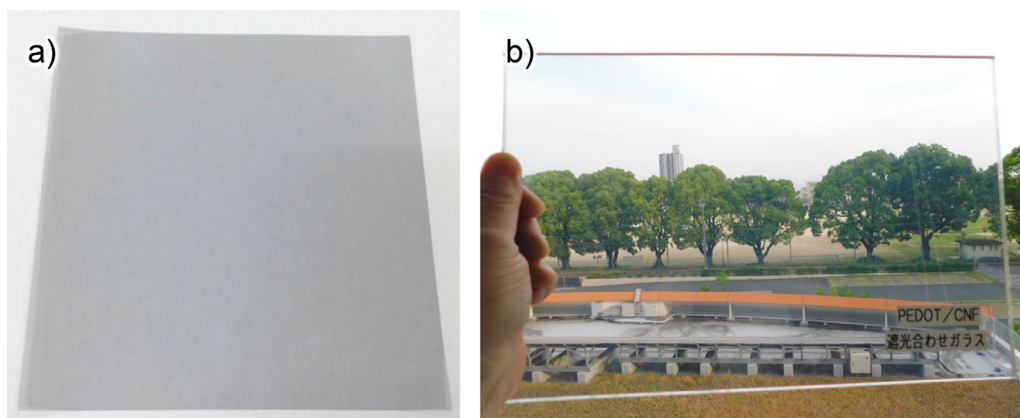


Fig. 7. PET film coated with PEDOT/s-CNF-PVA (a) and the double-paned glass incorporating its film as inner layer (b).

Scott Long, PhD, from Edanz Group (<https://en-author-services.edanzgroup.com/>) for editing a draft of this manuscript.

References

- [1] Y. Avlasevich, K. Müllen, Dibenzopentarylenebis(dicarboximide)s: novel near-infrared absorbing dyes, *Chem. Commun.* (2006) 4440–4442, <https://doi.org/10.1039/B610318A>.
- [2] G.K. Dalapati, A.K. Kushwaha, M. Sharma, V. Suresh, S. Shannigrahi, S. Zhuk, S.M. -Panah, Transparent heat regulating (THR) materials and coatings for energy saving window applications: impact of materials design, micro-structural, and interface quality on the THR performance, *Prog. Mater. Sci.* 95 (2018) 42–131, <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.02.007>.
- [3] S. Ray, U. Dutta, R. Das, P. Chatterjee, Modelling of experimentally measured optical characteristics of ITO/TiO₂ transparent multi-layer heat shields, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40 (2007) 2445–2451 <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/40/8/006/pdf>.
- [4] K. Katagiri, R. Takabatake, K. Inumaru, Robust infrared-shielding coating films prepared using perhydropolysilazane and hydrophobized indium tin oxide nanoparticles with tuned surface plasmon resonance, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 10240–10245, <https://doi.org/10.1021/am403011t>.
- [5] T. Abendroth, B. Schumm, S.A. Alajlan, A.M. Almogbel, G. Mäder, P. Härtel, H. Althues, S. Kaskel, Optical and thermal properties of transparent infrared blocking antimony doped tin oxide thin films, *Thin Solid Films* 624 (2017) 152–159, <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2017.01.028>.
- [6] C.-P. Li, C.-Y. Kang, S.-L. Huang, P.-T. Lee, H.-C. Kuo, F.-C. Hsu, Near infrared radiation shielding using CsxWO₃ nanoparticles for infrared mini light-emitting diodes, *Mater. Lett.* 260 (2020) 126961–126965, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126961>.
- [7] Q. Xu, L. Xiao, J. Ran, R. Tursun, G. Zhou, L. Deng, D. Tang, Q. Shu, J. Qin, G. Lu, P. Peng, Cs_{0.33}WO₃ as a high-performance transparent solar radiation shielding material for windows, *J. Appl. Phys.* 124 (2018) 193102–193108, <https://doi.org/10.1063/1.5050041>.
- [8] J.M. Bennett, E.J. Ashley, Infrared Reflectance and Emittance of Silver and Gold Evaporated in Ultrahigh Vacuum, *Appl. Opt.* 4 (1965) 221–224, <https://doi.org/10.1364/AO.4.000221>.
- [9] N. Ahmad, J. Stokes, N.A. Fox, M. Teng, M.J. Cryan, Ultra-thin metal films for enhanced solar absorption, *Nano Energy* 1 (2012) 777–782, <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2012.08.004>.
- [10] S. Pratesi, E. Sani, M.D. Lucia, Optical and structural characterization of nickel coatings for solar collector receivers, *Int. J. Photoenergy* (2014) 834128–834135, <https://doi.org/10.1155/2014/834128>.
- [11] R.G. Cooper, A.P. Harrison, The exposure to and health effects of Antimony, *Indian J. Occup. Environ. Med.* 13 (2009) 3–10, <https://doi.org/10.4103/0019-5278.50716>.
- [12] International Antimony Association, Proposed revision of RoHS directive concerns flame retardant industry, *Additives for Polymers* 2010 (2010) 4, [https://doi.org/10.1016/S0306-3747\(10\)70023-3](https://doi.org/10.1016/S0306-3747(10)70023-3).
- [13] J.-W. Park, G. Kim, S.-H. Lee, E.-H. Kim, G.-H. Lee, The effect of film micro-structures on cracking of transparent conductive oxide (TCO) coatings on polymer substrates, *Surf. Coat. Technol.* 205 (2010) 915–921, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.08.055>.
- [14] S. Im, C. Park, W. Cho, J. Kim, M. Jeong, J.H. Kim, Synthesis of solution-stable PEDOT-coated sulfonated polystyrene copolymer PEDOT:p(SS-co-St) particles for all-organic NIR-shielding films, *Coatings* 9 (2019) 151–162, <https://doi.org/10.3390/coatings9030151>.
- [15] M.-K. Lai, J.-R. Wu, J.-M. Yeh, S.H. Chang, Unraveling the modified PEDOT:PSS thin films based near-infrared solar-heat shields by using broadband transmittance and raman scattering spectrometers, *Phys. Status Solidi A* 216 (2019) 1900025–1900030, <https://doi.org/10.1002/psa.201900025>.
- [16] X. Chen, N. Yu, L. Zhang, Z. Liu, Z. Wang, Z. Chen, Synthesis of polypyrrole nanoparticles for constructing full-polymer UV/NIR-shielding film, *RSC Adv* 5 (2015) 96888–96895, <https://doi.org/10.1039/C5RA20164K>.
- [17] K. Sun, S. Zhang, P. Li, Y. Xia, X. Zhang, D. Du, F.H. Isikgor, J. Ouyang, Review on application of PEDOTs and PEDOT:PSS in energy conversion and storage devices, *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* 26 (2015) 4438–4462 <http://doi.org-443.webvpn.fjmu.edu.cn/10.1007/s10854-015-2895-5>.
- [18] K.-W. Seo, J. Lee, J. Jo, C. Cho, J.-Y. Lee, Highly efficient (>10%) flexible organic solar cells on PEDOT-free and ITO-free transparent electrodes, *Adv. Mater.* 31 (2019) 1902447–1902453, <https://doi.org/10.1002/adma.201902447>.
- [19] D.G. Yoon, M.G. Kang, J.B. Kim, K.-T. Kang, Nozzle printed-PEDOT:PSS for organic light emitting diodes with various dilution rates of ethanol, *Appl. Sci.* 8 (2018) 203–212, <https://doi.org/10.3390/app8020203>.
- [20] J. Park, H. Yoon, G. Kim, B. Lee, S. Lee, Highly customizable all solution-processed polymer light emitting diodes with inkjet printed ag and transfer printed conductive polymer electrodes, *Adv. Funct. Mater.* 29 (2019) 1902412–1902421, <https://doi.org/10.1002/adfm.201902412>.
- [21] Z. Fan, J. Ouyang, Thermoelectric properties of PEDOT:PSS, *Adv. Electron. Mater.* 5 (2019) 1800769–1800792, <https://doi.org/10.1002/aeml.201800769>.
- [22] I. Zozoulenko, A. Singh, S.K. Singh, V. Gueskine, X. Crispin, M. Berggren, Polarons, bipolarons, and absorption spectroscopy of PEDOT, *ACS Appl. Polym. Mater.* 1 (2019) 83–94, <https://doi.org/10.1021/acsapm.8b00061>.
- [23] Y. Mochizuki, T. Horii, H. Okuzaki, Effect of pH on structure and conductivity of PEDOT/PSS, *Trans. Mat. Res. Soc. Japan* 37 (2012) 307–310, <https://doi.org/10.14723/tmrj.37.307>.
- [24] M. R.-Reyes, I. Cruz-Cruz, R. López-Sandoval, Enhancement of the electrical conductivity in PEDOT:PSS films by the addition of dimethyl sulfate, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 20220–20224, <https://doi.org/10.1021/jp107386x>.
- [25] Q. Zhao, R. Jamal, L. Zhang, M. Wang, T. Abdiryim, The structure and properties of PEDOT synthesized by template-free solution method, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 557–566, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-557>.
- [26] H. Shi, C. Liu, Q. Jiang, J. Xu, Effective approaches to improve the electrical conductivity of PEDOT:PSS: a review, *Adv. Electron. Mater.* 1 (2015) 1500017–1500033, <https://doi.org/10.1002/aeml.201500017>.
- [27] J. Ouyang, Q. Xu, C.-W. Chu, Y. Yang, G. Li, J. Shinar, On the mechanism of conductivity enhancement in poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrene sulfonate) film through solvent treatment, *Polymer (Guildf)* 45 (2004) 8443–8450, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.10.001>.
- [28] M. Jikei, T. Yamaya, S. Uramoto, K. Matsumoto, Conductivity enhancement of PEDOT/PSS films by solvent vapor treatment, *Int. J. Soc. Mater. Eng. Resour.* 20 (2014) 158–162, <https://doi.org/10.5188/ijmsr.20.158>.
- [29] M. Horikawa, T. Fujiki, T. Shirotsaki, N. Ryu, H. Sakurai, S. Nagaoka, H. Ihara, The development of a highly conductive PEDOT system by doping with partially crystalline sulfated cellulose and its electric conductivity, *J. Mater. Chem. C* 3 (2015) 8881–8887, <https://doi.org/10.1039/C5TC02074C>.
- [30] JIS R 3106: 1998, "Testing method on transmittance and emittance of flat glasses and evaluation of solar heat gain coefficient", Japanese Standards Association, 4-14-24, Akasaka, Minato-ku, Tokyo, (1998) 107–844 Japan (Reaffirmed 2012-10-22); <http://www.webstore.jsa.or.jp/webstore/Top/indexEn.jsp?lang=en>.

Short Communication

Activated sludge microbiome in a membrane bioreactor for treating Ramen noodle-soup wastewater

(Received November 16, 2019; Accepted January 14, 2020; J-STAGE Advance publication date: August 21, 2020)

Ryoichi Tanaka,¹ Katsuya Nouzaki,^{1,*} Ronald R. Navarro,² Tomohiro Inaba,² Tomo Aoyagi,² Yuya Sato,² Atsushi Ogata,² Hiroshi Yanagishita,³ Tomoyuki Hori,² and Hiroshi Habe^{2,*}

¹ Kumamoto Industrial Research Institute, 3-11-38 Higashimachi, Higashi-ku, Kumamoto 862-0901, Japan

² Environmental Management Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan

³ Department of Industry-Government and Community Collaboration, Hiroshima University, 1-3-2 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-8511, Japan

Population shifts in the activated sludge microbiome of a membrane bioreactor (MBR) during the treatment of Ramen noodle-soup wastewater were analyzed by high-throughput sequencing. An MBR underwent stable treatment of wastewater containing increasing oil concentrations (from 135 to 1,350 mg/L) for 26 days; however, after feeding with wastewater containing 2,700 mg/L of oil, the mixed liquor suspended solids and transmembrane pressure exhibited gradual and rapid increases, respectively, leading to clogging of the membrane. Phylogenetic analysis revealed an oil supply-dependent increase in the abundance of *Cupriavidus gilardii* (relative abundance of 26.2% at Day 30) in the sludge together with *Parasegetibacter terrae* (9.9%) and *Ferruginibacter yonginensis* (9.4%). These dominant species may play important roles in noodle-soup wastewater treatment.

Key Words: activated sludge; high-throughput sequencing; membrane bioreactor; microbial community structure; noodle-soup wastewater treatment

Oily wastewater is generated in many industrial processes, including those related to oil and gas, and foods and beverages. Because such wastewater adversely affects

the environment (Sato et al., 2019), region-specific regulations on the discharge of oily wastewater to the environment have become stricter (Tanudjaja et al., 2019). In particular, the treatment of wastewater containing fats, oils, and grease from the food industry is of major concern, and dissolved air floatation, froth floatation, coagulation, and adsorption have been used to treat oily wastewater. Recently, increasing attention has focused on membrane-based technology for oil-water separation (Tanudjaja et al., 2019) because membrane separation processes are capable of removing large quantities of oil; however, membrane fouling adversely affects the operational management and cost of membrane filtration. Considering that oily wastewater from the food industry is of varied composition depending on its origin and process, wastewater type-specific treatment methods are needed. In this study, as an example of high-strength oily wastewater, the treatment of Ramen noodle-soup wastewater was investigated using a membrane bioreactor (MBR), which combines biodegradation and membrane filtration. We evaluated the limit of membrane performance in terms of oil concentration and the sludge microbiome related to oil degradation. To this end, we operated a laboratory-scale MBR for 30 days and examined changes in the microbial community structure in response to oil concentration by high-throughput Illumina MiSeq sequencing (Navarro et al., 2016).

The Ramen noodle-soup wastewater was prepared using a Ramen kit (Shigemitsu Industry Co., Ltd., Kumamoto, Japan). After the Ramen noodles were cooked according to the instructions of the kit (one serving uses

*Corresponding authors: Hiroshi Habe, Environmental Management Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan; Katsuya Nouzaki, Kumamoto Industrial Research Institute, 3-11-38 Higashimachi, Higashi-ku, Kumamoto 862-0901, Japan.

Tel: +81-29-861-6247 Fax: +81-29-861-8326 E-mail: hiroshi.habe@aist.go.jp

Tel: +81-96-368-2101 Fax: +81-96-369-1938 E-mail: nouzaki@kumamoto-iri.jp

None of the authors of this manuscript has any financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence their work.

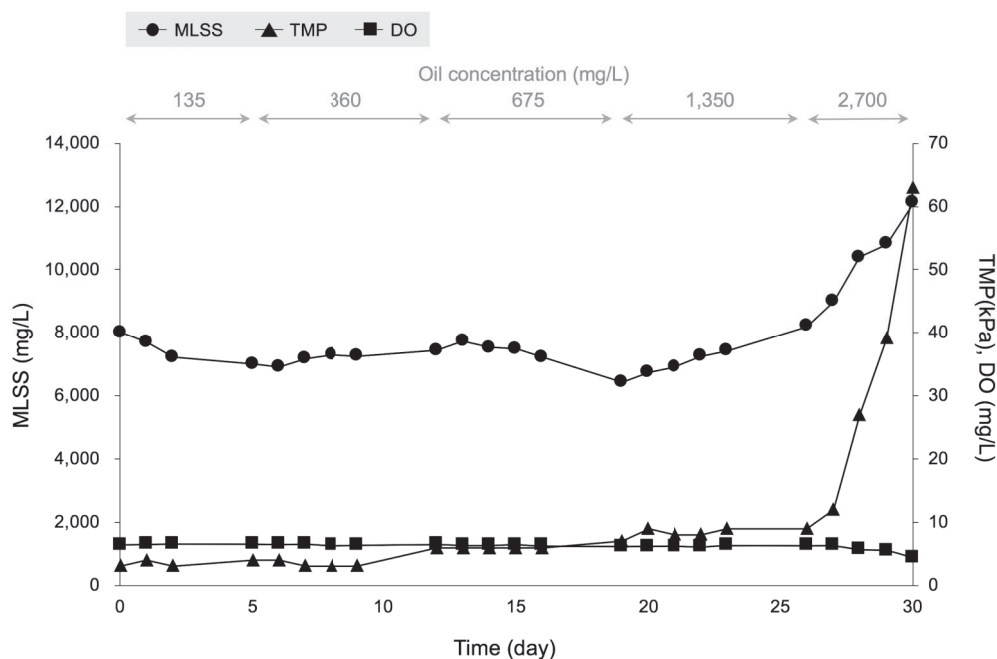


Fig. 1. Physicochemical parameters of the MBR during operation.

Closed circle, MLSS in the sludge; closed triangle, TMP; closed square, DO. Arrows on top indicate the oil concentration of the inlet wastewater and the corresponding periods.

270 mL of water), the remaining noodle soup was sterilized by autoclaving. The resultant noodle-soup wastewater as an undiluted solution was stored at 4°C until use. Several properties of the undiluted wastewater (pH 5.7) were analyzed by Nodaichi-Denshi Co., Ltd. (Kumamoto, Japan) as follows: biological oxygen demand (BOD), 250,000 mg/L; suspended solid (SS) concentration, 19,000 mg/L; and oil content (n-hexane extract), 27,000 mg/L. The laboratory-scale MBR comprised three compartments, the operating volumes of which were 12, 10.5, and 4.5 L (left to right in Fig. S1; total 27 L). The reactor was started up with an inoculum of activated sludge obtained from a food-industry wastewater treatment plant (Plenus-foods Co., Ltd., Fukuoka, Japan), and the sludge was stirred by continuous aeration. Air was provided through an air diffuser set in each compartment at a flow rate of 3 L/min. A laboratory-scale M-fine flat membrane module (Awa Paper Mfg., Co., Tokushima, Japan) made of polyacrylonitrile was submerged in the reactor during operation. The effective surface area of one membrane module was 0.012 m² with a pore size of 0.07 μm, and two membrane modules were used for permeation of the treated water during operation (total surface area, 0.024 m²). Two membrane modules were operated with a cycle of permeate extraction for 9 min and a pause for 1 min, and the membrane surface was aerated continuously to reduce membrane fouling. The bioreactor was constantly fed with the above wastewater after dilution and heating in a feed tank (5 L) at 50°C. The concentration of oil in the feed wastewater increased gradually from 135 mg/L (200-fold dilution of the undiluted wastewater, for 5 days) to 360 mg/L (75-fold, for 7 days) and 675 mg/L (40-fold, for 7 days), and from 1,350 mg/L (20-fold, for 7 days) to 2,700 mg/L (10-fold, for 4 days). The flow rates of the

input wastewater and the output membrane-filtrated permeate were 5 L/day (3.5 mL/min, 5.4-day hydraulic retention time [HRT]), despite the changes in the dilution rates. During the experimental period, no sludge was withdrawn from the reactor except for sampling. The return sludge flow rate was 100 mL/min.

Mixed liquor SSs (MLSSs), temperature, dissolved oxygen (DO), pH, and transmembrane pressure (TMP) were monitored during the operation of the reactor. An 80 mL sample of the activated sludge (second compartment of the reactor) was removed five times per week. The solid constituent of the activated sludge was removed by centrifugation (15,300 × g, 15 min, 4°C), and the resulting supernatant was filtered through a cellulose acetate membrane (ø, 0.20 μm, C020A025A; Advantec, Tokyo, Japan). The water-soluble total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) contents in the supernatant and treated effluent were analyzed using a TOC-TN analyzer (TOC-L/TNM-L; Shimadzu, Kyoto, Japan).

For DNA extraction, the collected activated sludge samples were washed once with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and stored at −20°C as a pellet until use. DNA was extracted from the sludge samples according to a direct lysis protocol (Noll et al., 2005) and treated with RNase (Type II-A; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The purified DNA was used as the template for PCR amplification with a high-fidelity DNA polymerase (Q5; NEB, Ipswich, MA). The V4 region of each 16S rRNA gene was amplified using the universal primers 515F and 806R with an Illumina adapter region (both primers) and a 12 bp barcode for multiplex sequencing (reverse primer) (Caporaso et al., 2010).

High-throughput sequencing was carried out as follows. The PCR products, purified with an AMPure XP Kit

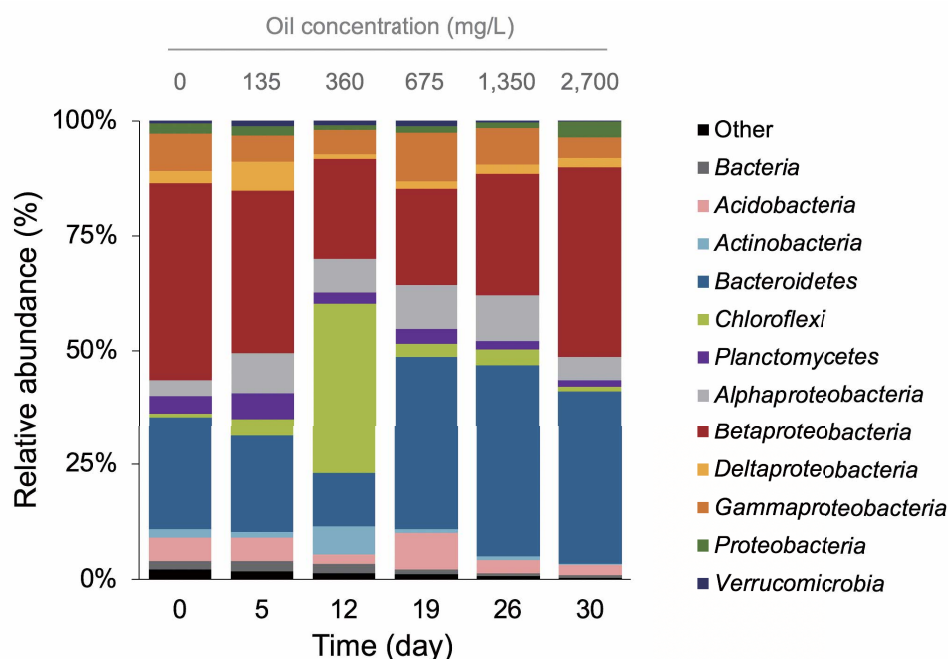


Fig. 2. Microbial community structures of the MBR during operation.

The community structure in activated sludge was analyzed by Illumina sequencing of 16S rRNA genes. Relative abundances of the sequences at the phylum and class levels are shown. Phylogenetic groups that showed more than 3% relative abundance are displayed individually. The taxonomy was assigned by QIIME analysis with Greengenes database ver. 13_8. The numbers on top are oil concentrations.

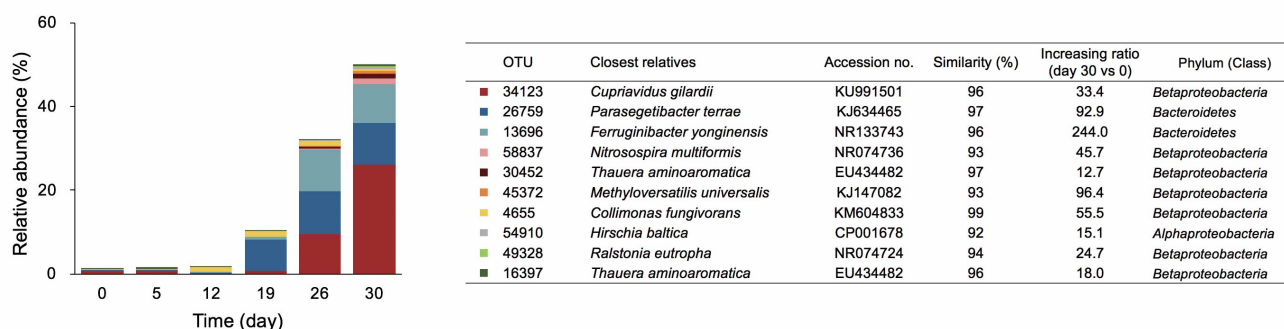


Fig. 3. Changes in relative abundances of the top ten most dominant OTUs detected on Day 30.

Each bar denotes the relative abundance of the OTU corresponding to the table at right. The closest relative, accession number, and similarity score, as predicted by BLAST analysis, are shown in the table. The increase ratio was calculated from the relative abundances on Days 0 and 30. The phylum or class of each OTU was predicted by QIIME.

(Beckman Coulter, Brea, CA), were subjected to agarose gel electrophoresis and each target DNA band was excised and recovered with a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). An appropriate amount of the 16S rRNA gene segments and an internal control (PhiX Control v. 3; Illumina, San Diego, CA) were subjected to paired-end sequencing using a 300-cycle MiSeq Reagent Kit (Illumina) and a MiSeq Sequencer (Illumina). Removal of PhiX, low-quality (Phred value score [Q], < 30), and chimeric sequences, and assembly of the paired-end sequences were carried out according to a previous report (Itoh et al., 2014). Contaminating PhiX sequences in the Illumina sequence libraries were detected by means of a homology search against the Greengenes database (DeSantis et al., 2006) using Burrows-Wheeler Aligner v. 4.0.5 (Li and Durbin, 2009). Next, the PhiX sequences

were removed from the library using self-written scripts. The paired-end sequences were joined with the fastq-join tool in ea-utils software, v. 1.1.2-301 (Aronesty, 2013). Joined sequences with Q scores of ≥ 30 were collected using QIIME software v. 1.7.0 (Caporaso et al., 2012), and aligned using Mothur v. 1.31.2 (Schloss et al., 2009). Chimeric sequences were detected and excluded from the library. The sequences in each library were characterized phylogenetically using QIIME software (Schloss et al., 2009). The closest relative of the operational taxonomic units (OTUs) was determined based on the results of a BLAST search of their 16S rRNA sequences with those in the National Center for Biotechnology Information nucleotide sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The raw sequence data in this study were deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) under accession number

DRA009057 (18 libraries).

Reactor performance during wastewater feeding is shown in Fig. 1. During the period, the DO values were maintained at 5.4 to 6.7 mg/L (average, 6.28 mg/L), suggesting the presence of sufficient oxygen for microbial oxidation of organic compounds. During feeding with wastewater containing oil concentrations of 135 mg/L (200-fold dilution of undiluted wastewater) to 1,350 mg/L (20-fold dilution), reactor performance was relatively stable without an increase in the TMP value (<10 kPa). The MLSS concentrations in the reactor were maintained at 6,000 to 8,000 mg/L (Fig. 1). The water-soluble TOC concentration of the effluent was maintained at <10 mg/L, achieving > 90% removal based on the values in the second compartment of the MBR (Fig. S2). Also, the water-soluble TN concentration of the effluent became <10 mg/L after Day 19.

By contrast, the addition of wastewater containing 2,700 mg/L (10-fold dilution) of oil on Day 26 resulted in sudden changes in reactor performance. These were particularly evident in the MLSS concentrations and TMP values (Fig. 1). A gradual increase in the MLSS concentration to 12,100 mg/L on Day 30 was observed (Fig. 1). Such a large sludge biomass may have contributed to the increase in TMP. Indeed, the TMP value increased prominently from 9 kPa on Day 26 to 63 kPa on Day 30 (Fig. 1), during which time the effluent flow rate decreased rapidly, indicating the initiation of membrane fouling. Once such a breakpoint is reached, prolonged operation will not allow the recovery of MBR performance. Hence, we stopped operation of the MBR at Day 30.

The sludge microbial communities in the MBR were examined by high-throughput Illumina sequencing of 16S rRNA genes. The total number of sequences obtained from six sludge samples was around 330,000, corresponding to an average of 18,261 sequences per library (minimum, 7,431; maximum, 30,917; standard deviation, 7,475). Phylum- and class-level phylogenetic analyses of the Illumina sequence data using QIIME software and the Greengenes database were conducted to assess the composition of the sludge microbial communities during MBR operation (Fig. 2). *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, and *Bacteroidetes* predominated in the initial activated sludge, accounting for 42.8%, 8.0%, and 24.4%, respectively, of the total sludge biomass (Fig. 2). Although the physico-chemical parameters were relatively stable on Day 12, the populations of these predominant microbial groups were altered, resulting in a decrease in the abundance of *Betaproteobacteria* and *Bacteroidetes*.

Instead, the population of the phylum *Chloroflexi* increased on Day 12 to a relative abundance of 37.2% (Fig. 2). An OTU-level phylogenetic analysis revealed that the most dominant OTU of the phylum *Chloroflexi* was OTU30731, which showed only 91.0% identity with *Caldilinea aerophila* (relative abundance, 35.4% of the total population and 95.2% of *Chloroflexi*). Subsequently, the abundance of OTU30731 decreased markedly and accounted for 2.9% of the total on Day 19. The phylum *Chloroflexi* plays an important structural role in activated sludge floc formation and can also cause bulking and foaming problems (Kragelund et al., 2011). *Chloroflexi* do not

always destroy settling properties (e.g., filamentous members of *Caldilineae* in wastewater treatment plants are reported to be the predominant floc-stabilizing bacteria) (Yoon et al., 2010). Upon the initiation of MBR operation, activated sludge began to produce a surface foam layer; however, after Day 10, the foam gradually disappeared. Because we did not evaluate whether OTU30731 is involved in stabilizing the floc structure, further study of *Caldilineae*-related OTUs is warranted.

We investigated the microbial species at the OTU level that responded to the increase in oil concentration fed to the MBR. The top ten most dominant OTUs on Day 30 and the time-dependent changes in their relative abundances are shown in Fig. 3. The top three most abundant microbial species on Day 30 (OTU34123, OTU26759, and OTU13696) accounted for about 45.4% of the total population; their closest relatives were *Cupriavidus gilardii* (96% identity), *Parasegetibacter terrae* (97%), and *Ferruginibacter yonginensis* (96%), respectively (Fig. 3). The relative abundance of these three OTUs on Day 12 was 0.5% (0.1% of OTU34123, 0.3% of OTU26759, and 0.1% of OTU13696); that on Day 19 was 8.9% (0.8%, 7.5%, and 0.6%, respectively), and that on Day 26 was 29.6% (9.5%, 10.3%, and 9.8%, respectively) (Fig. 3). The increase ratios of the respective OTUs from Day 30 to Day 0 were 33.4, 92.9, and 244 fold, respectively. The genus *Cupriavidus* can degrade crude oil (French and Terry, 2019) and herbicides (Wu et al., 2017). Also, *Cupriavidus* is reported to exhibit metal resistance (Huang et al., 2019). These facts suggest that OTU34123, which is related to *C. gilardii*, is relatively resistant to stressful conditions, and is involved in oil degradation in wastewater. In addition, the genus *Parasegetibacter* can degrade extracellular DNA (Kim et al., 2015; Zhang et al., 2019), and so might contribute to biomass reduction in the MBR by eliminating DNA released by dead microbial cells. *Ferruginibacter yonginensis* has been reported to show hydrolytic activity towards gelatin, peptides (trypsin activity), and C4 esters (Lee et al., 2014). Because Ramen noodle-soup contains high concentrations of oils as well as proteins extracted from pork bones, the metabolic features of *F. yonginensis* likely contribute to the degradation of organic matter in wastewater. In addition, this bacterium has *N*-acetyl- β -glucosaminidase activity. As *N*-acetyl- β -glucosamine is a component of bacterial cell walls, *F. yonginensis* likely plays a role in the reduction of the sludge biomass. The predominance of the three OTUs suggests that they play important roles in the treatment of Ramen noodle-soup wastewater.

In conclusion, we investigated the performance and sludge microbial community of a laboratory-scale MBR fed with Ramen noodle-soup wastewater according to oil concentration. This is the first report on the use of this type of wastewater in an MBR. The MBR was stable up to 20-fold diluted model wastewater, but its performance deteriorated at higher oil concentrations. Hence, oil concentrations of 1,350 to 2,700 mg/L as well as BOD of 12,500 to 25,000 mg/L in the feed wastewater are the limit for operating an MBR system without causing membrane fouling. Illumina sequencing of 16S rRNA genes showed that three OTUs became predominant with increasing oil

concentrations (Fig. 3). Because OTU34123 is related to *C. gilardii*, which is reported to be an oil degrader, quantitation of the OTU34123 16S rRNA gene sequence in sludge may be an indicator of Ramen noodle-soup treatment status. Further characterization of OTU34123 after isolation is needed to clarify the mechanisms of wastewater treatment.

Acknowledgments

We thank JNC Environment Corp. (Chiba, Japan) for providing the activated sludge samples.

Supplementary Materials

Supplementary figures are available in our J-STAGE site (<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jgam>).

References

- Aronesty, E. (2013) Comparison of sequencing utility programs. *Open Bioinforma J.*, **7**, 1–8.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D. et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, **7**, 335–336.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J. et al. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.*, **6**, 1621–1624.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L. et al. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 5069–5072.
- French, K. E. and Terry, N. (2019) A high-throughput fluorescens-based assay for rapid identification of petroleum-degrading bacteria. *Front. Microbiol.*, **10**, 1318.
- Huang, N., Mao, J., Hu, M., Wang, X., and Huo, M. (2019) Responses to copper stress in the metal-resistant bacterium *Cupriavidus gilardii* CR3: A whole-transcriptome analysis. *J. Basic Microbiol.*, **59**, 446–457.
- Itoh, H., Navarro, R. R., Takeshita, K., Tago, K., Hayatsu, M. et al. (2014) Bacterial population succession and adaptation affected by insecticide application and soil spraying history. *Front. Microbiol.*, **5**, 457.
- Kim, S. J., Ahn, J. H., Weon, H. Y., Hong, S. B., Seok, S. J. et al. (2015) *Parasegetibacter terrae* sp. nov., isolated from paddy soil and emended description of the genus *Parasegetibacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 113–116.
- Kragelund, C., Thomsen, T. R., Mielczarek, A. T., and Nielsen, P. H. (2011) Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum *Chloroflexi*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **76**, 451–462.
- Lee, B. I., Kang, H., Kim, H., Joung, Y., and Joh, K. (2014) *Ferruginibacter yonginensis* sp. nov., isolated from a mesotrophic artificial lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 846–850.
- Li, H. and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25**, 1754–1760.
- Navarro, R. R., Hori, T., Sato, Y., Tanaka, R., Ogata, A. et al. (2016) High susceptibility of aerobic microbiota in membrane bioreactor sludge towards olive oil as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA genes. *J. Environ. Chem. Eng.*, **4**, 4292–4299.
- Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M., and Liesack, W. (2005) Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ. Microbiol.*, **7**, 382–395.
- Sato, Y., Hori, T., Koike, H., Navarro, R. R., Ogata, A. et al. (2019) Transcriptome analysis of activated sludge microbiomes reveals an unexpected role of minority nitrifiers in carbon metabolism. *Commun. Biol.*, **2**, 179.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M. et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7537–7541.
- Tanudjaja, H. J., Hejase, C. A., Taravara, V. V., Fane, A. G., and Chew, J. W. (2019) Membrane-based separation for oily wastewater: A practical perspective. *Wat. Res.*, **156**, 347–365.
- Wu, X., Wang, W., Liu, J., Pan, D., Tu, X. et al. (2017) Rapid biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Cupriavidus gilardii* T-1. *J. Agric. Food. Chem.*, **65**, 3711–3720.
- Yoon, D.-N., Park, S.-J., Kim, S.-J., Jeon, C. O., Chae, J.-C. et al. (2010) Isolation, characterization, and abundance of filamentous members of *Caldilineae* in activated sludge. *J. Microbiol.*, **48**, 275–283.
- Zhang, J., Sui, Q., Lu, T., Zhong, H., Shen, P. et al. (2019) Sludge bio-drying followed by land application could control the spread of antibiotic resistance genes. *Environ. Int.*, **130**, 104906.

キトサン微粒子のストレプトコッカス ミュータンスに対する抗菌効果と 歯磨材としての研磨効果

齋田 佳菜子*・永岡 昭二**・城崎 智洋**・堀川 真希**・伊原 博隆***

* 食品加工技術室、** 材料・地域資源室、*** 熊本大学大学院先端科学研究部（現：沖縄工業高等専門学校）

Dispersible chitosan particles showing bacteriostatic effect against *Streptococcus mutans*
and their dental polishing effect

SAITA Kanako*, NAGAOKA Shoji**, SHIROSAKI Tomohiro**, HORIKAWA Maki** and IHARA Hirotaka***

Nontoxic and biodegradable chitosan is potentially useful in various applications. We prepared submicron chitosan particles with high dispersibility in aqueous solution utilizing the electrostatic interaction phase separation method described in a previous report, but using citric acid as the polyvalent anionic compound instead of sodium sulfate. The submicron chitosan particles showed significant antibacterial activity and anti-adhesive action against *Streptococcus mutans*, even at around neutral pH. However, chitosan granules showed no antibacterial activity under the same conditions. The addition of the chitosan particles to dental polishing paste provided stainless steel discs (the same hardness as dental enamel) with a smoother surface than polishing paste without additives. In view of their submicron size and antibacterial activity, chitosan particles could potentially be multifunctional components of oral and dental cleaning materials.

1. Introduction

Streptococcus mutans is a Gram-positive bacterium that is commonly found in the human oral cavity. *S. mutans* produces exopolysaccharides, such as soluble and insoluble glucans, from dietary sucrose via the action of glucosyltransferase, and these polysaccharide products adhere to the surfaces of the teeth¹⁾²⁾. Furthermore, *S. mutans* induces decalcification of tooth hydroxylapatite by metabolizing dietary sugar to lactic acid, thereby creating an acidic environment that results in dental caries. Therefore, dentifrice materials with antibacterial activity against *S. mutans* would prevent dental caries during oral health care³⁾. Chlorhexidine is commonly used as the antimicrobial in oral care, including for dental caries⁴⁾. However, chlorhexidine has several side effects, including taste disorders and tooth staining. In Japan the use of chlorhexidine in mucous irrigation has been prohibited since 1985 owing to cases of anaphylaxis. Therefore, natural and safe agents with antimicrobial activity against cariogenic bacteria are desired for oral care.

Chitosan is a cationic biopolymer of β -(1,4)-linked D-glucosamine that is formed by the deacetylation of chitin, the second most abundant natural polysaccharide (after cellulose). Chitosan serves as a biocompatible and nontoxic biomaterial and is biodegraded by lysozymes in human saliva⁵⁾⁶⁾. Chitosan also possesses antibacterial activity against *S. mutans*⁶⁻¹¹⁾ and inhibits bacterial adhesion to the tooth surface⁵⁾⁷⁾⁹⁾¹²⁾⁻¹⁴⁾.

However, chitosan has a highly crystalline structure, derived from intra- and intermolecular hydrogen bonding, and has poor solubility properties at pH levels greater than its pKa (~ 6.0). In addition, chitosan only demonstrates antibacterial activity in low pH conditions¹⁵⁾⁻¹⁷⁾. In our previous studies, we prepared submicron dispersed chitosan particles (DCPs) using two phase separation methods; electrostatic interaction between the cationic amino groups of chitosan and polyvalent anionic compounds, such as sodium sulfate¹⁸⁾; and complex formation between boric acid and sugar chains¹⁹⁾²⁰⁾, which used no surfactant or organic solvent. The DCPs were shown to have antimicrobial activity against *Escherichia coli* at neutral pH

¹⁸⁾²⁰⁾. In this study, we used phase separation by electrostatic interaction to prepare DCPs using citric acid as the polyvalent anionic compound instead of sodium sulfate as was previously reported¹⁸⁾. Citric acid was selected because it is edible and is used as a food additive.

The aim of this study was to investigate whether DCPs displayed inhibitory effects against *S. mutans* at neutral pH, without being affected by lysozymes. We also aimed to examine the effects of these DCPs in dental polishing paste. The prepared DCPs demonstrated high dispersibility and became positively charged in distilled water. The results demonstrated that the DCPs are of potential use as multifunctional materials for dental care because of their excellent antibacterial effects, inhibition of glucan adhesion and polishing properties.

2. Material and methods

2.1 Materials

Chitosan granules (Chitosan-g, 85 mol% deacetylated, 70-100 kDa molecular weight range) was purchased from Dainichiseika Color & Chemicals Mfg. Co., Ltd., Tokyo, Japan. Citric acid and lysozyme were purchased from Nacalai Tesque, Co., Ltd., Kyoto, Japan. *Streptococcus mutans* NBRC 13955 was purchased from the National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center (NBRC), Tokyo, Japan. Brain heart infusion (BHI) was purchased from Nippon Suisan Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan and Mitis Salivarius agar (Difco) was purchased from Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA.

2.2 Preparation and characterization of DCPs

DCPs were prepared using the phase separation method, reported previously¹⁸⁻²⁰⁾. Chitosan-g was dissolved in a given amount of citric acid aqueous solution (1.0, 1.5 or 2.0 equivalents of citric acid carboxy groups relative to chitosan amino groups) at 60° C with stirring. After stirring for 30 min, the chitosan solution was cooled to 20° C. During cooling, the solution gradually became cloudy and white precipitate was produced; this indicated that the chitosan interacted electrostatically with the citric acid. The chitosan particle dispersion was isolated by filtration.

The obtained DCPs-1.0, 1.5 and 2.0 (1.0, 1.5 and 2.0 equivalents, respectively, of citric acid carboxy groups relative to chitosan amino groups) were observed by stereomicroscopy (KH-7700S; Hirox Co., Ltd., Tokyo, Japan). The particle

sizes were determined using a dynamic flow particle image analyzer (FPIA-3000; Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). The zeta potential of the particles was measured by the laser Doppler method (Zetasizer Nano ZS; Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK).

2.3 Antibacterial activity

S. mutans was used as a reference for oral pathogenic bacteria. *S. mutans* cells were incubated at 37 ° C for 24 h in BHI medium. The assay was carried out using DCPs and Chitosan-g concentrations (as starting materials) in the range 0.0025 to 0.1 wt%. The control contained no chitosan samples. Serial samples were added to glass vials and mixed with 5 mL Mitis Salivarius agar (pH 7.0) as a testing medium. The *S. mutans* culture suspension was inoculated with $2.0-6.0 \times 10^6$ cfu/mL into the test medium containing chitosan samples and the glass vials were filled with CO₂ gas. The antibacterial activity of the chitosan samples was analyzed by microcalorimetry (H-201; Nippon Medical & Chemical Instruments Co., Ltd., Osaka, Japan) to record a growth curve of *S. mutans* incubation at 37 ° C for 24 h.

2.4 Influence of lysozymes

DCPs-1.0 (0.1 wt%) was suspended in artificial saliva (14.5 mM NaCl, 16.1 mM KCl, 1.31 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.55 mM MgCl₂ · 6H₂O and 1.96 mM K₂HPO₄) in sterile plastic tubes as test samples. *S. mutans* culture suspension was incubated at 37 ° C for 24 h in BHI medium. The *S. mutans* culture suspension ($2.0-6.0 \times 10^6$ cfu/mL) was then inoculated into the test samples with and without lysozyme solutions (11 mg/mL). The culture suspension was incubated at room temperature on a rotator (3 rpm). *S. mutans* viable cell counts of the test samples were determined on Mitis Salivarius agar at 0, 1, 2, 4, 8, 16 and 24 h.

2.5 Inhibition of polysaccharide adhesion

Hemispheric discs were prepared with denture resin (Unifast III; GC Corporation, Tokyo, Japan). The assay was carried out using DCPs-1.0 and Chitosan-g concentrations (as starting materials) in the range 0.0025 to 0.1 wt%. The *S. mutans* culture suspension was incubated at 37 ° C for 24 h in BHI medium. The discs were placed into BHI medium including 5.0 wt% of sucrose. Next, chitosan samples were added, and the mixture was inoculated with *S. mutans* culture suspension. After incubation for 24 h at 37 ° C, the discs were removed and the soluble polysaccharides were

washed off with distilled water (five times). The adhering insoluble polysaccharides were removed using ultrasonication (150 W, 38 kHz, 1 min). The amount of insoluble polysaccharides was determined by the phenol-sulfuric acid method.

2.6 Polishing effect

Polishing test samples were prepared by mixing Chitosan-g or DCPs-1.0 dispersion (1.0 wt%, 64 g) with 40 g of polishing paste²¹⁾. As the polishing paste contained diatomite powder (mean diameter $37 \pm 10 \mu\text{m}$), Adonest coarse, Neo Dental Chemical Products Co., Ltd was used. Stainless steel discs (Vickers hardness: 323; surface roughness (R_a): 180.1 nm; 304 CSP; Sinto Kogyo, Ltd., Nagoya, Japan) were used as specimens in the polishing test. Because the polishing system consists of a stainless steel substrate, we adopted a polishing method for the chemical mechanical planarization of the surface of a semiconductor substrate, such as a silicon wafer²²⁾.

The polishing test was carried out using the polishing system (MA-300e; Musashino Denshi, Co., Ltd., Musashino, Japan) at a rotation speed of 100 rpm, a polishing time of 30 min, a polishing test sample dropping rate of 2.5 mL/min, and with distilled water as the lubricant. It is known that the polishing pressure is 200-1000 g in the case of adults²³⁾. Therefore, to ensure an adequate load in the polishing experiment, 400 g of pressure was set. Also, in order to observe significant damage, planarity and scratches on the surface, we adopted a polishing time of 30 min. After the polishing test, the stainless steel discs were washed with tap water and ultrasonicated in distilled water for 5 min to completely remove the polishing test sample. The initial and final R_a of the stainless steel discs was measured by stylus profilometry (Dektak 150; Bruker Corporation, Massachusetts, USA). Five measurements of R_a were determined on random parts of the stainless steel discs, and the mean and standard deviation were calculated. The initial and final surfaces of the stainless steel discs were observed by stereomicroscope (KH-7700S; Hirox Co. Ltd.).

3. Results and discussion

3.1 Characterization of DCPs

DCPs were prepared by the phase separation method using citric acid as the polyvalent anion. After dissolving Chitosan-g in aqueous citric acid solution, the solution gradually became turbid on cooling to room temperature. The

turbidity of the suspension changed with increasing citric acid concentration, as shown in Figure S1. Over the course of 1 hour of precipitation, the upper region of the suspension gradually became clear in the case of DCPs-1.5 and -2.0. This indicated that on the addition of citric acid, DCPs-1.5 and -2.0 gradually precipitated owing to their increasing size, resulting from aggregation (Figure 1). In contrast, DCPs-1.0 maintained a particle dispersion of submicron size without aggregation. As shown in Figure 2-a, the particle size of the DCPs increased with the addition of citric acid. The particles were thought to be formed by ionic interaction between the amino groups of chitosan and the carboxy groups of citric acid. The increase in aggregation of the DCPs was caused by an increase in ionic interaction with excess citric acid. The Chitosan-g aggregates of chitosan ground-microproduct had an average aggregate size of $17.9 \mu\text{m}$ measured using a dynamic flow particle image analyzer (Figure 2-a). Chitosan-g had a wide particle size distribution and showed aggregates of greater than $100 \mu\text{m}$ (Figure 1). In contrast, the dispersed DCPs-1.0 had a size of $1.8 \mu\text{m}$ and narrow size distribution, as observed by stereomicroscopy.

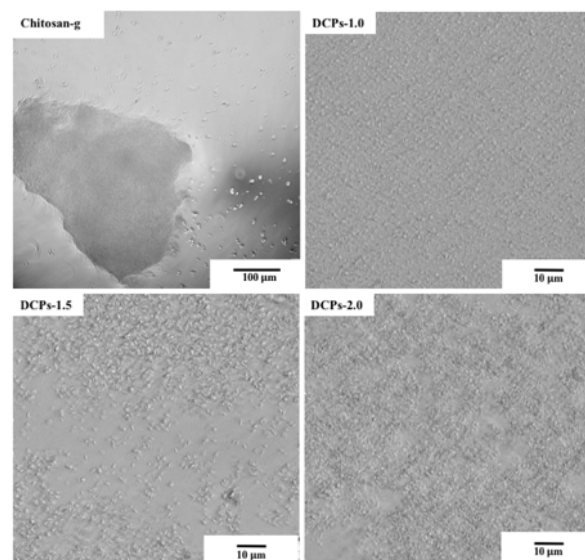


Figure 1. Stereomicroscope images of DCPs (DCPs-1.0, 1.5 and 2.0) or granules (Chitosan-g) in aqueous dispersion.

Zeta potential indicates the electric charge on a particle surface by electrophoresis. For DCPs, the zeta potential is attributed to protonated amino groups on the particle surface (Figure 2-b). The DCPs had better dispersibility owing to electrostatic repulsion among the positively

charged particles, which resulted for the increased cationic properties of the DCPs. Therefore, the antibacterial activity of DCPs in disrupting negatively charged bacterial surfaces increased. The zeta potential of the DCPs increased with the positive charge of DCPs-1.0 (19.63 ± 0.49 mV), DCPs-1.5 (11.53 ± 0.32 mV) and DCPs-2.0 (8.76 ± 0.74 mV).

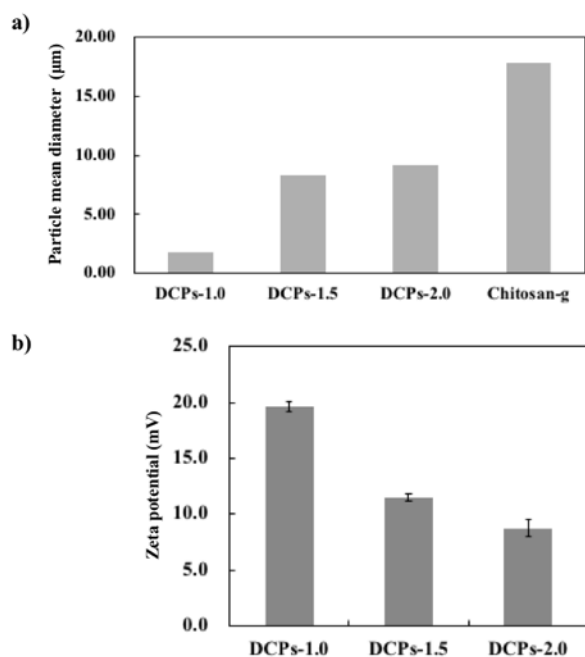


Figure 2. Particle size (a) and zeta potentials (b) of DCPs-1.0, 1.5 and 2.0 or chitosan granules (Chitosan-g) in aqueous dispersion. Particle sizes were determined using a dynamic flow particle image analyzer. All measurements were performed in triplicate, and the mean was calculated. Zeta potentials were determined using a laser Doppler method. All measurements were performed in triplicate, and the mean and standard deviation were calculated. The error bars indicate one standard deviation from the mean.

In addition, aggregation of the DCPs was observed to be more significant (by stereomicroscopy) with the addition of citric acid, as shown in Figure 1. This indicated that the number of free chitosan amino groups decreased with the addition of citric acid.

3.2 Antibacterial activity

Oral care products should have a pH around neutrality because hydroxyapatite, which constitutes approximately 95% of dental enamel, experiences demineralization and dissolve rapidly below pH 5.5. We investigated the

antibacterial activity of DCPs and Chitosan-g against the oral pathogenic bacterium *S. mutans* at neutral pH. We used isothermal microcalorimetry to monitor the bacterial growth. In this system, a peak in the thermogram represents the logarithmic phase of growth²⁴. As can be seen from Figure 3, the peak was delayed or undetected when DCPs were added to sample-compared with a control (without DCPs). In the evaluation of antibacterial activity using isothermal microcalorimetry, the minimum inhibitory concentration (MIC) exhibited almost the same thermogram as the blank (no inoculum) [25]. In Figure 3, the thermogenetic peak of DCPs was absent (0.05 wt.% for DCPs-1.0 and 0.1 wt.% for DCPs-1.5 and -2.0) compared with the control, in spite of giving a little rise to the thermogram compared with the blank. The antibacterial activity of DCPs was thought to be bacteriostatic activity, which leads to growth delays rather than growth inhibitory activity against *S. mutans*. At all concentrations (0.0025-0.1 wt%) of Chitosan-g, the observed growth of *S. mutans* had a thermogenesis pattern that was almost identical to that of the control. This indicated that the Chitosan-g had no antibacterial activity. The zeta potential of Chitosan-g was approximately 16 mV. Therefore, the positive charge of DCPs and Chitosan-g increased in the order DCPs-1.0 > Chitosan-g > DCPs-1.5 > DCPs-2.0 (Figure 2). Similarly, the apparent pKa value of Chitosan-g and DCPs was also considered to increase in the order of positive charge. In contrast, the antibacterial activities of all types of DCP were higher than that of Chitosan-g, despite the apparent pKa or zeta potential values. These phenomena are attributed to the size effect of the DCP particles. This suggests that DCPs-1.0, -1.5 and DCPs-2.0 have more contact sites with the bacteria surface than Chitosan-g. That is, DCPs have more free amino groups that are able to actually drive antibacterial activity. DCPs, which are positively charged, inhibit bacterial growth by forming perturbing interactions with the negatively charged bacterial outer membrane, leading to cytoplasmic leakage^{15, 26, 27}. As detailed in our previous report²⁰, scanning electron microscopy (SEM) revealed that chitosan-SO₄²⁻ particles cause the bursting of *E. coli* cells (Figure S2). The higher antibacterial activity of 0.05 wt% DCPs-1.0 over that of DCPs-1.5 and 2.0 is attributed to the fact that DCPs-1.0 has the highest dispersibility and the greatest positive charge. This is derived from the regular accumulation of free cationic amino

groups on the DCPs surface.

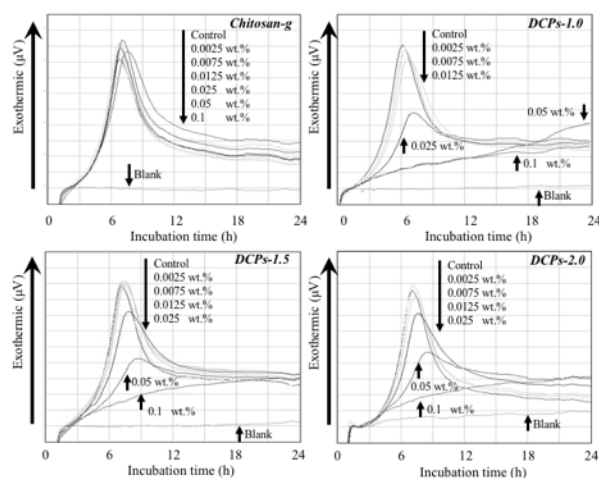


Figure 3. Antibacterial activity of Chitosan-g or DCPs-1.0, 1.5 and 2.0 concentrations in the range of 0.0025 to 0.1 wt% against *S. mutans*, as determined by growth thermogram. Control: no chitosan samples. Blank: no inoculum.

The antibacterial activity of other chitosan materials against *S. mutans* at around neutral pH has been reported. High and low molecular weight chitosan were reported to have MIC and MBC of a few mg/mL¹¹⁾, the MIC of water-soluble chitosan was found to be 1.25 g/L¹²⁾. The antibacterial activity of DCPs demonstrated that expanding the specific surface area of DCPs by particulation provided a greater number of interaction points between the free amino groups of the DCP surface and the negatively charged cell wall of *S. mutans*. In contrast, chitosan nanoparticles displayed superior antibacterial activity²⁸⁾, however chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation have been reported to show poor reproducibility and there is limited physicochemical understanding of the particle formation, which has inhibited their biomedical application²⁹⁾.

Because of its superior antibacterial activity over the other formulations, DCPs-1.0 was selected for the study of the effect of lysozymes on antibacterial activity and polysaccharide adhesion of *S. mutans*, and the polishing effect of stainless steel discs.

3.3 Influence of lysozymes

Figure 4 shows the antibacterial activities of DCPs-1.0 (particle concentration: 0.1 wt%) against *S. mutans* under the influence of lysozymes in artificial saliva. The lysozyme concentration (11 mg/mL) used was based on the

concentration of lysozyme in saliva secreted as a result of stimuli³⁰⁾. The viable cell counts of *S. mutans* in the control sample showed little change over 24 h, with or without lysozymes. In the presence of DCP, the viable cell counts of *S. mutans* gradually decreased over the first 8 h, and were also not detectable after 16 h, with or without lysozymes. In general, chitosan can be degraded to D-glucosamine by lysozymes⁵⁾⁶⁾. Moreover, the low molecular weight chitosan and chitosan oligosaccharide that the lysozyme produces as degradation products of chitosan, show greater antibacterial effect, owing to their increasing solubility in water³¹⁾. The combination of chitosan and lysozyme showed antibacterial effects against *S. mutans* compared with chitosan only⁶⁾. This inhibitory effect is thought to be derived from the products of chitosan degradation by lysozyme or independent inhibitory effect of chitosan and lysozyme. DCP-1.0 was difficult to degrade using lysozyme, which is attributed to the particle shape. Based on these observations, lysozyme is not thought to affect the antibacterial activity of DCP-1.0.

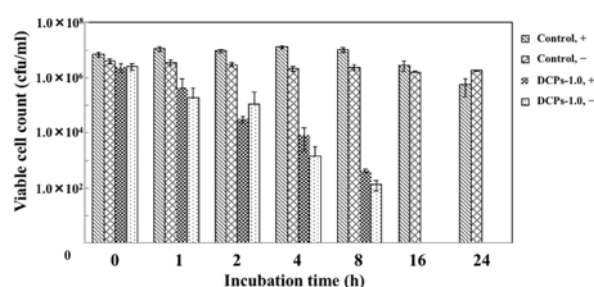


Figure 4. Influence of lysozymes in artificial saliva on the antibacterial activity of DCPs-1.0 against *S. mutans*. The change in viable cell count of *S. mutans*, with (+) or without (-) the addition of 11 mg/mL lysozyme, for the no chitosan sample (control) and the DCPs-1.0 sample is shown. All measurements were performed in triplicate, and the mean and standard deviation were calculated. The error bars indicate one standard deviation from the mean.

3.4 Inhibition of polysaccharide adhesion

Cariogenic bacteria, including *S. mutans*, form biofilms known as plaque on the surface of teeth. In plaque, exopolysaccharide matrix produced by the cariogenic bacteria fills the extracellular space among the bacterial colony. Insoluble glucan produced by glucosyltransferase of *S. mutans* is one of the components exopolysaccharide matrix, and is strongly adhesive. Table 1

summarizes the effect of DCPs and Chitosan-g on the adhesion of insoluble *S. mutans* polysaccharides to denture resin discs. DCPs-1.0 showed no polysaccharide adhesion at concentrations as low as 0.025 wt%, which were found to exhibit a little bacteriostatic activity in Figure 3. Low molecular weight chitosan was reported to show inhibition of adhesion on hydroxyapatite beads at sub-MIC¹³⁾. It appears that the antibacterial activity of chitosan relates to the inhibition of adhesion, therefore the viability of *S. mutans* on glass slide decreased after treatment with chitosan¹⁴⁾. Although inhibition of the adhesion effect of DCPs is thought to have the same mechanism, it may also be that chitosan at a concentration of bacteriostatic activity or sub-MIC, influences the production of glucosyltransferase of *S. mutans* by interfering with the negatively charged *S. mutans* cell wall. The mechanism of chitosan and DCP inhibition of *S. mutans* adhesion via insoluble glucan requires further investigation.

Table 1. Insoluble glucan content on disc from *S. mutans* with control (no chitosan sample), Chitosan-g and DCPs-1.0.

Sample	Concentration (wt%)	adherent polysaccharide (μg)
Control	-	89.0±4.1
Chitosan-g	0.025	7.0±1.9
	0.05	9.6±3.2
	0.1	9.8±0.7
DCPs-1.0	0.025	0.0±0.0
	0.05	0.0±0.0
	0.1	0.0±0.0

Incubation condition: 37 ° C, 24 h. All measurements were performed in triplicate, and the mean and standard deviation were calculated.

3.5 Polishing effect

DCPs-1.0 were added to dental polishing paste to clean, whiten and smoothen dental surfaces³²⁾³³⁾. Figure 5 summarizes the abbreviations of stainless steel discs treated with various types of polishing paste and those that were non-treated. The initial and final surfaces of the stainless steel discs were observed by stereomicroscopy, as shown in Figure 5. The stainless steel discs, which have a similar hardness level to dental enamel (Vickers hardness: 323), were used for the polishing test. The rough spots were mostly observed on the surface of stainless steel discs without treatment. Treatment with polishing paste generated scratches instead of removing the rough spots.

Subsequently, treatment with polishing paste

that contained DCPs-1.0 also generated scratches. However, the scratches appeared to be shallower than those obtained from treatment with the chitosan-free polishing paste (Figure 5-c). In contrast, treatment with polishing paste that contained Chitosan-g generated deeper scratches than any other treatment. The R_a of the stainless steel disc treated with polishing paste containing DCPs-1.0 was the smallest of all of the discs (Figure 5-d). Because DCPs-1.0 has a small size ($\sim 1.0 \mu\text{m}$), they are likely to absorb the shock of the polishing agent against the tooth efficiently. In addition, the intermolecular distance between the chitosan chains appears to expand easily because of the positive charge of the DCPs-1.0 at neutral pH. Therefore, it was suggested that the DCPs-1.0 had a positive polishing effect on the surface of stainless steel discs.

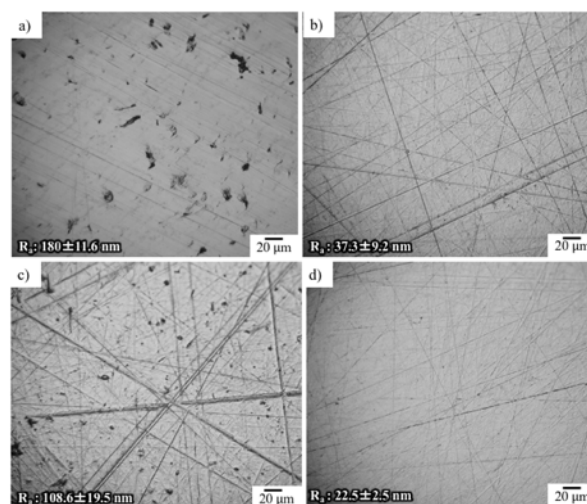


Figure 5. Stereomicroscope images of stainless steel discs treated with various types of polishing paste and their surface roughness (R_a) (All measurements were performed in quintet, and the mean and standard deviation were calculated.). a) original (non-treatment) disc, b) Disc-non-additive, c) Disc-Chitosan-g and d) Disc-DCPs-1.0.

4. Conclusion

DCPs were prepared by the phase separation method using citric acid as the polyvalent anion. At neutral pH, the prepared DCPs showed high dispersibility. They also demonstrated higher antibacterial activity than Chitosan-g against *S. mutans*, without being affected by lysozymes. Furthermore, the DCPs-1.0 displayed greater inhibitory effects on the adhesion of *S. mutans*-derived insoluble glucans than Chitosan-g.

Finally, the treatment of stainless steel discs with dental polishing paste containing DCPs-1.0 provided a smoother surface than those treated with dental polishing paste without additives.

5. Acknowledgments

This work was supported by JSPS KAKENHI [JP15K21703]. We thank K. Okuzono and T. Yamamoto (Daiichi Seimo Co., Ltd., Japan) for their collaboration on the preparation of DCPs. We thank Amy Tong, Hayden Peacock, PhD and Srah Dodds, from Edanz Group (www.edanzediting.com/ac) for editing a draft of this manuscript.

6. Author Contribution

K. S. and S. N conceived and designed the experiments. K. S. carried out the experiments and described the manuscript. S. N. discussed and reviewed this manuscript. T. S. and M. H. verified the analytical methods. H. I. supervised the project. All authors approved the manuscript to be published, and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

7. Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

8. Funding

This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number [JP15K21703].

This is an electronic version of an article published in Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry [Volume 84., No.6, pp1265-1273, 2020 of publication]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry is available online at: www.tandfonline.com/Article DOI: 10.1080/09168451.2020.1723402.

Reference

- 1) Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, et al. Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. J Dent Res., Vol. 80, pp. 1672-1677, 2001.
- 2) Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. J Clin

- Periodontol., Vol. 32 (Suppl. 6), pp. 7-15, 2005.
- 3) Davies RM, Toothpaste in the control of plaque/gingivitis and periodontitis. Periodontology 2000., Vol. 48, pp. 23-30, 2008.
- 4) Pupe CG, Villardi M, Rodrigues CR, et al. Preparation and evaluation of antimicrobial activity of nanosystems for the control of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Int J Nanomedicine., Vol. 6, pp. 2581-2590, 2011.
- 5) Freier T, Koh HS, Kazazian K, et al. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation Biomaterials., Vol. 26, pp. 5872-5878, 2005.
- 6) Sarasam AR, Brown P, Khajotia SS, et al. Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens. J Mater Sci: Mater Med., Vol. 19, pp. 1083-1090, 2008.
- 7) Costa EM, Silva S, Madureira AR, et al. A Comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. Carbohydr Polymers., Vol. 101, pp. 1081-1086, 2014.
- 8) Chen C-Y, Chung Y-C, Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*. J Appl Oral Sci., Vol. 20, pp. 620-627, 2012.
- 9) Verkaik MJ, Busscher HJ, Jager D, et al. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms *in vitro*. J Dent., Vol. 39: pp. 218-224, 2011.
- 10) Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, et al. Chitosan-containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion. J Dent., Vol. 35, pp. 871-874, 2007.
- 11) Costa EM, Silva S, Pina C, et al. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. Anaerobe., Vol. 18, pp. 305-309, 2012.
- 12) Bae K, Jun EJ, Lee SM, et al. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. Clin Oral Invest., Vol. 10, pp. 102-107, 2010.
- 13) Tarsi R, Muzzarelli RA, Guzman CA, et al. Inhibition of *streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. J Dent Res., Vol. 76, pp. 665-672, 1997.
- 14) Busscher HJ, Engels E, Dijkstra JB, et al. Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth in vitro. Eur J Oral Sci., Vol. 116, pp. 493-495, 2008.
- 15) Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, et al. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Int J Food Microbiol., Vol. 71, pp. 235-244, 2001.
- 16) Qin C, Li H, Xiao Q, et al. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. Carbohydr

- Polymer, Vol. 63, pp. 367-374, 2006.
- 17) Aiedeh K, Taha MO, Synthesis of iron-crosslinked chitosan succinate and iron-crosslinked hydroxamated chitosan succinate and their in vitro evaluation as potential matrix materials for oral theophylline sustained-release beads. Eur J Pharma Sci., Vol. 13, pp. 159-168, 2001.
 - 18) Saita K, Nagaoka S, Horikawa M et al. Chitosan sub-micron particles prepared using sulfate ion salt as bacteriostatic materials in neutral pH condition. J Biomater Nanobiotech., Vol. 2, pp. 347-352, 2011.
 - 19) Nagaoka S, Saita K, Kobayashi S, et al. Preparation of dispersible chitosan particles with borate crosslinking for antimicrobial and antifungal application. Chem Lett., Vol. 39, pp. 935-937, 2010.
 - 20) Saita K, Nagaoka S, Horikawa M, et al. Preparation and characterization of dispersible chitosan particles with borate crosslinking and their antimicrobial and antifungal activity. Carbohy Res., Vol. 349, pp. 52-58, 2012.
 - 21) Kawaguchi N, Yamamoto Y, Jpn Patent. JP5444856.
 - 22) Gaikwad RM, Sokolov I, Silica nanoparticles to polish tooth surfaces for caries prevention. J Dent Res. Vol. 10, pp. 980-998, 20083.
 - 23) Shibui N, Suzuki K, [The polishing effect of different types of polishing paste - assessment on the polishing surface of metal sheets-]. Jpn J Pediatr Dent., Vol. 35, pp. 583-590, 1997.
 - 24) Braissant O, Bonkat G, Wirtz D, et al. Microbial growth and isothermal microcalorimetry: Growth models and their application to microcalorimetric data. Thermochimica Acta., Vol. 555, pp. 64-71, 2013.
 - 25) von Ah U, Wirz D, Daniels AU. Isothermal micro calorimetry--a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. BMC Microbiol., Vol. 9, pp. 106, 2009.
 - 26) Raafat D, von Bargaen K, Haas A, et al. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. Appl Environ Microbiol., Vol. 74, pp. 3764-3773, 2008.
 - 27) Kong M, Chen XG, Xing K, et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. Int J Food Microbiol., Vol. 144, pp. 51-63, 2010.
 - 28) Cha ´vez de Paz LE, Resin A, Howard KA, et al. Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on *Streptococcus mutans* Biofilms. Appl Environ Microbiol., Vol. 77, pp. 3892-3895, 2011.
 - 29) Sreekumar S, Goycoolea FM, Moerschbacher BM. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. Sci Reports., Vol. 8, pp. 4695, 2018.
 - 30) Hayakawa T, Suda T, Kizaki H, et al. [Oral biochemistry 5th ed.]. Tokyo: Ishiyaku Publishers, Inc.; 2011. Japan.
 - 31) Changa SH, Lina HTV, Wu GJ, et al. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. Carbohy Polymer, Vol. 134, pp. 74-81, 2015.
 - 32) Choi MS, Lee YK, Lim BS, et al. Changes in surface characteristics of dental resin composites after polishing. J Mater Sci Mater Med., Vol. 16, pp. 347-353, 2005.
 - 33) Heintzea SD, Forjanic M, Rousson V, Surface roughness and gloss of dental materials as a function of force and polishing time in vitro. Dent Mater., Vol. 22, pp. 146-165, 2006.
- この論文は、B.B.B. Vol. 84, pp.1265-1273, 2020 に掲載された論文の転載である。DOI: 10.1080/09168451.2020.1723402)

10 年大型プロジェクト・くまもと有機薄膜技術高度化支援センターの完結

－ 熊本県における有機エレクトロニクス事業の展開 －

永岡 昭二*・松枝 寛**・土村 将範***

* 材料・地域資源室、** ものづくり室、*** 所長室

Completion of Large Project, "Kumamoto Institute for Photo-Electro Organics (PHOENICS)"

－ Development of Photo-Electro Organics Project in Kumamoto Prefecture－

NAGAOKA Shoji*, MATSUEDA Hiroshi ** and TSUCHIMURA Masanori***

2011年4月から続いた「くまもと有機薄膜技術高度化支援センター」(Kumamoto Photo-Electro Organics: 通称PHOENICS)が2021年3月に完結した。本事業は10年間の長期にわたり、熊本県産業技術センターのみならず熊本県や県内の産業界においても大きな地域連携拠点のプロジェクトであった。そこで、くまもと有機薄膜技術高度化支援センターの設立・いきさつから、長期間に及ぶ事業実施における各種研究開発や県内企業等での事業化等の成果の概要について報告する。

1. はじめに

当時、広域的地域産業活性化活動等支援事業（経済産業省）に熊本県の提案が採択され、有機薄膜技術を対象とする産学官のネットワーク形成を推進することとなった。このことをきっかけとして、2009年2月に九州イノベーション創出促進協議会や九州半導体イノベーション協議会などと連携し、「有機薄膜研究会」が発足した。東京エレクトロン（株）や平田機工（株）の協力のもと、表1に示すように、月1回程度のペースで研究会が開催された。発会式ではマスコミも参加し、毎回、定員100名を上回る参加者（年間1,000名以上）があり、大盛況となった。これは県内には当時、太陽電池メーカーなどが存在し、太陽電池や有機ELなどへの関心が高かったことを物語っている。

表1 事業開始前の地域での新事業への期待

2009年の有機薄膜研究会の活動記録

回	期日	参加者	基調講演の内容および講師
第1回	2009年2月6日	145名	太陽電池技術あれこれ 産業技術総合研究所 太陽光発電研究センター 櫻井 敬一郎 氏
第2回	2009年3月16日	164名	爆発する太陽電池産業 野村證券（株） 金融研究所 和田木 徹哉 氏
第3回	2009年4月28日	159名	有機ELデバイスと製造・評価、その可能性 技術コンサルタント、元東北バイオニア常務執行委員 富摩 照夫 氏
第4回	2009年6月12日	122名	有機薄膜型太陽電池の動作原理と製造プロセスおよびその課題 産業技術総合研究所 太陽光発電研究センター 富摩 哲也 氏
第5回	2009年7月10日	105名	有機ELデバイス、動作原理と製造プロセスおよびその課題 九州大学 先端物質化学研究所 先端素子材料部門 藤田 克彦 氏
第6回	2009年8月7日	109名	色素増感太陽電池の動作原理と製造プロセスおよびその課題 九州工業大学 大学院 生命体工学研究科 教授 早瀬 修二 氏
第7回	2009年10月23日	111名	白色有機EL技術の現状とその応用およびその課題 －プロセスから実装まで－ パナソニック電工（株）先行技術開発研究所 技監 塩田 卓哉 氏

当時の所長の強烈的な指導のもと、永岡と入庁直後の材料・地域資源室の城崎氏、その当時、ものづくり室長であった河北氏および県産業支援課担当の田副氏とともに講師と参加者の取りまとめと司会進行および懇親会の段取りなどに忙殺された。毎回、研究会の終了後、すぐに次の研究会の参加希望メールが来て、休む間もなく、苦勞したのを思い出す。

2. くまもと有機薄膜技術高度化支援センターの設立にむけて

有機薄膜研究会が発足した2009年4月に文部科学省が全都道府県に産学官拠点と形成するという目標のもと、リーマンショック後の追加経済対策の一環として、2009年度補正予算案に695億円を計上した（図1）。科学技術振興機構（JST）が事業主体となる、いわゆる“地域産学官拠点整備事業”である。プレス発表後、当時の所長と県産業支援課長の指導のもと、当県も本事業に申請することとなった。

当時の活動記録を図2に示す。マスコミへのプレス発表後5月の連休明けに、城崎氏と共に当時福岡市にあったJST福岡プラザに情報収集のため、赴いた。さらに同月28日にJSTから数名熊本県庁に来庁され、本事業の詳細説明があった。熊本県の特徴としての半導体産業に替わるものとして、太陽電池や有機ELの開発およびその周辺技術を主題とした有機薄膜研究会の開催実績をもとに有機薄膜技術にかかわる電子デバイス関連のプロジェクト内容で申請することとなった。当初の予算計上額は20億円。膨大な申請

書の素案は永岡（技術関連部分の担当）と田副氏（行政関連部分の担当）で記載し、所長による監修のもと、作り込みを行い完成させ同年8月20日に提出した。

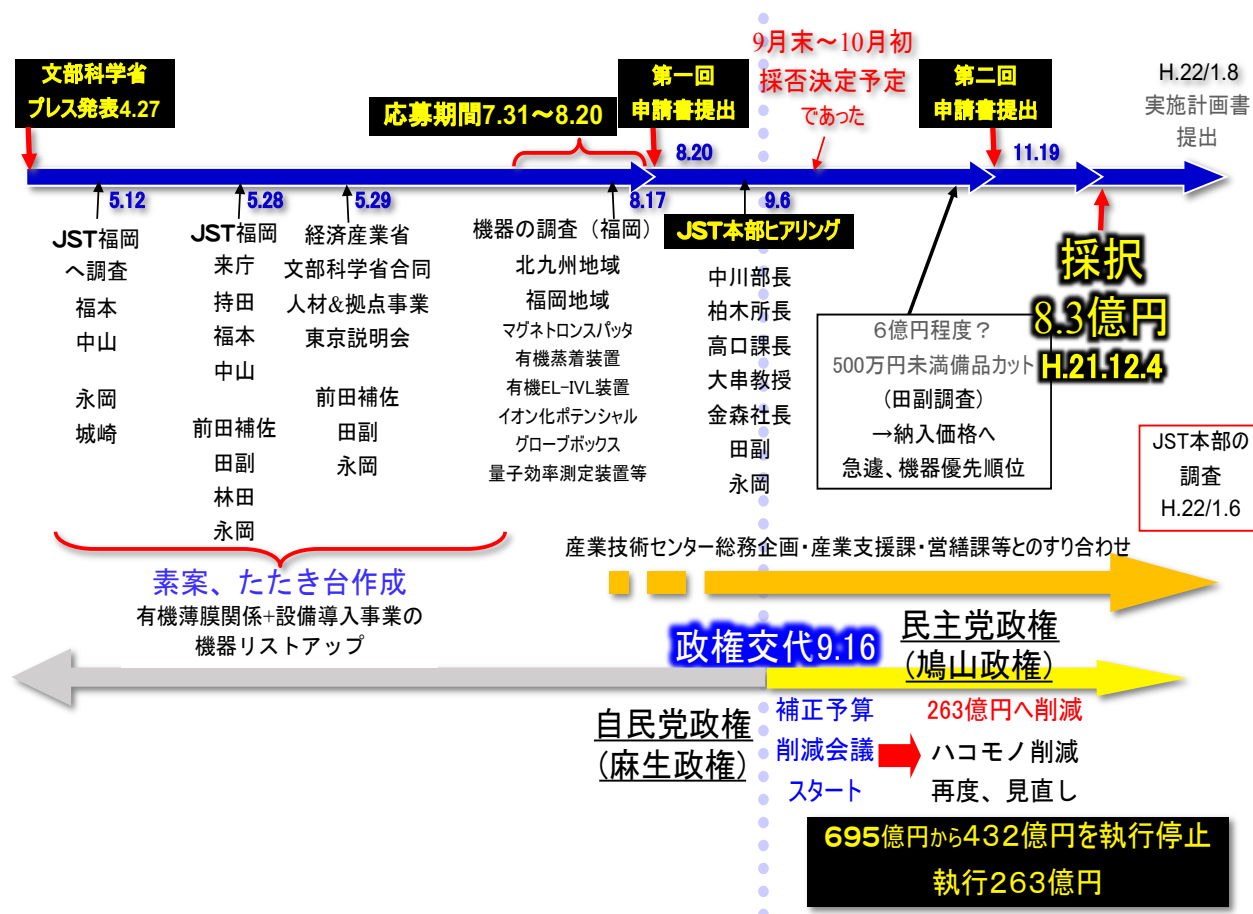
3. 事業ヒアリングと採択、民主党への政権交代、そして予算減額

提出の半月後となる9月6日JST本部でのヒアリング資料も我々で完成させた。熊本大学と熊本県と熊本県工業連合会との共同申請であったため、ヒアリングには当時の県商工観光労働部長、所長、産業支援課長、熊本県工業連合会の幹事長と熊本大学イノベーション推進機構の教授が参加し、永岡と田副氏も同席しJST本部において実施された。このヒアリングの直前、県東京事務所において商工観光労働部長と所長がプレゼンの練習を何度も行い、本番に臨んだことを記憶している。

特に、当時は民主党への政権交代の時期であった（2009年9月16日）ため、JSTの副理事から「地域産学官共同研究拠点整備事業の予算がどうなるかわからないが、当初の計画通り、ヒアリングを受けてください」という言葉があったのが印象的だった。ヒアリングは9月6日で、10月初旬には採否がわかるという当初の日程であったが、9月16日に政権交代となり、採否は延期されたものの12月4日には正式採択が決定した。最終的に、当初の国の全体予算695億円から263億円に削減された。県の当初の計画では、予算20億円を計上し、この予算の中で研究棟も整備する



図1 平成21年4月23日熊本日日新聞の記事



予定であったが、政権交代の影響で建物以外の機械・設備のみ事業費として認められるということになり、実際の採択額は8.3億円に減額された。

そして、翌年は1年間かけて、機械・設備36機種の導入を進めた。好都合であったのは、当時、当センターは県予算24億円をかけて新館建設中であり、センターリニューアルに向けた建屋の新築工事が行われていたことである。県財政が厳しい中、JSTから交付決定となった設備・機器導入のための8.3億円の事業予算は、当センターにとっては恵みの雨であったのは間違いない。

4. 2011年 PHOENICS 設立と運営

2011年3月、熊本県、熊本大学並びに熊本県工業連合会が共同で次世代太陽電池である有機系太陽電池やエレクトロルミネッセンスおよびその関連周辺部材・プロセスに基づいて地域産業が新たなビジネスチャンスを見いだすことを目的とし、産学官連携体制を整備するための「くまもと有機薄膜技術高度化支援センター」(Kumamoto Photo-Electro Organics: 通称PHOENICS)が産業技術センター内に設立された(図3)。本センターは技術高度化支援、産学官共同研究、人材の育成、ネットワーク形成、研究成果の普及をミッションに国内外の機関と連携しながら、技術移転を行う研究拠点を目指す。組織としては、拠点強化担当、研究推進担当、実用化支援担当、広報連携マーケティング担当、知財・技術動向調査担当からなる経営企画委員会を設置し、年に4回程度開催し、運営を行った。研究推進担当においては、熊本大学を中心として、材料開発ユニットとプロセ

ス開発ユニットの研究ユニットを組織し、微粒子応用、機能薄膜、ナノカーボン、界面創製、光機能創出、成膜プロセス、薄膜の特性評価、インクジェット開発、OLED実用化からなる9つのプロジェクトを推進している。プロジェクトにおける研究人材は、センター長(当時の熊本大学学長:谷口功氏)により、企業、大学、公設研究機関のうち、有機エレクトロニクスに関連する材料分野やプロセス分野に携わってきた研究者・技術者をPHOENICS連携研究員として、当センターの材料・地域資源室の職員の一部、4名も含む29名が委嘱された。

永岡は、研究推進担当であったため、年4回開催される経営企画委員会のたびに、熊本大学、崇城大学および九州大学に所属する29名の連携研究員全員の論文、特許、学会報告件数の業績を調査し、とりまとめを行った。とりまとめ作業が煩雑で苦労したが、5年間で29名の連携研究員の実績は、論文101報、特許42報、国内外学会の件数528件にのぼり、多くの業績をまとめ上げることができた。

一方、くまもと有機薄膜技術高度化支援センターは設備・機器の拠点でもあり、この拠点に優秀な人材を招聘するという一方で、PHOENICS設立に少し遅れて、文科省の5年間プロジェクト“地域イノベーション戦略支援プログラム”にも採択された。このプログラムの中で、熊本大学、崇城大学および九州大学において、6名のポスドク研究員(現産業技術センター職員:吉田氏も含まれる)が招聘された。このプログラムの中で彼らには業績ノルマがあり、5年間で、6名で論文数40報、特許出願件数が16件とそれぞれの目標値があった。特に、論文数の目標値をクリアするのにはたいへん苦労した。参加する大学間で



格差が生じており、思うように論文の実績数を伸ばせず、最終的には熊本大学研究ユニット長のご尽力もあり、最終年度の3月(2016年3月)の事業終了間際に、目標値42報とクリアすることができた。

5. PHOENICS のミッションとその意義

研究推進ユニットの業績＝100%実用化とはなかなかいかない。しかしながら、本事業では図4のような地域企業における産業振興体制を産学官連携で構築しており、研究推進ユニットの中からくまもと有機エレクトロニクス産業促進協議会へと成果を移行して実用化させたものもある。例として、数種のインクジェット成膜装置、ミストを用いた回転型大気圧成膜装置、塗膜材、表面処理材、遮光材料、研磨材の開発などの事業化実績を生み出している。(図5～10参照)

また特筆すべきこととして、PHOENICSのミッションの一つに実用化研究による地域産業への貢献だけでなく、2011年に産業技術センターに導入した36機種の装置を活用した企業支援への貢献など、地域企業に対する経済波及効果も期待されていた。たとえば、電界放出型走査型電子顕微鏡のように、年間1,000時間の利用実績を超える機器もある。これらの導入機器・設備の活用により、品質管理・工程改善で

も恩恵を受けた企業はたいへん多いと感じる。また、いくつかの企業において、あるいは弊所においても技術者・研究者の雇用が生まれるなど、人材育成に対する波及効果も極めて大きかった。さらにPHOENICSのプロジェクトをもとにして、新たな競争的研究資金などの研究資金の獲得および産学、学官、産学官、産産連携などによる共同研究の場となり、本事業の県経済への貢献度は極めて高かったと考える。

6. 今後の地域企業への貢献に向けて

今後、コロナ禍の中でどんな新たな技術や事業が将来必要となるか正確な予測は難しい。本事業の10年間はPHOENICS関係者を中心に大きな苦労はあったが、新技術や事業への挑戦にセンターが本庁と密接に協力し意欲的に実行できた。その結果として、機器・設備にも恵まれた。しかし、PHOENICSの装置・設備も10年経過し、使いこなしたが故に、経年劣化が生じているのは否めない。今後のセンターの技術ポテンシャルの維持、機能強化のためにも、新たな試みも必要であると考え。若い職員にはモチベーションを高く維持し、将来のストラテジを描いてもらいたい。研究業務と指導業務は表裏一体。熊本県産業技術センターのポテンシャル維持は将来のセンターの機能強化にも繋がる。また、研究機関として

有機エレクトロニクス産業振興体制 概要図(H23-R2年度)

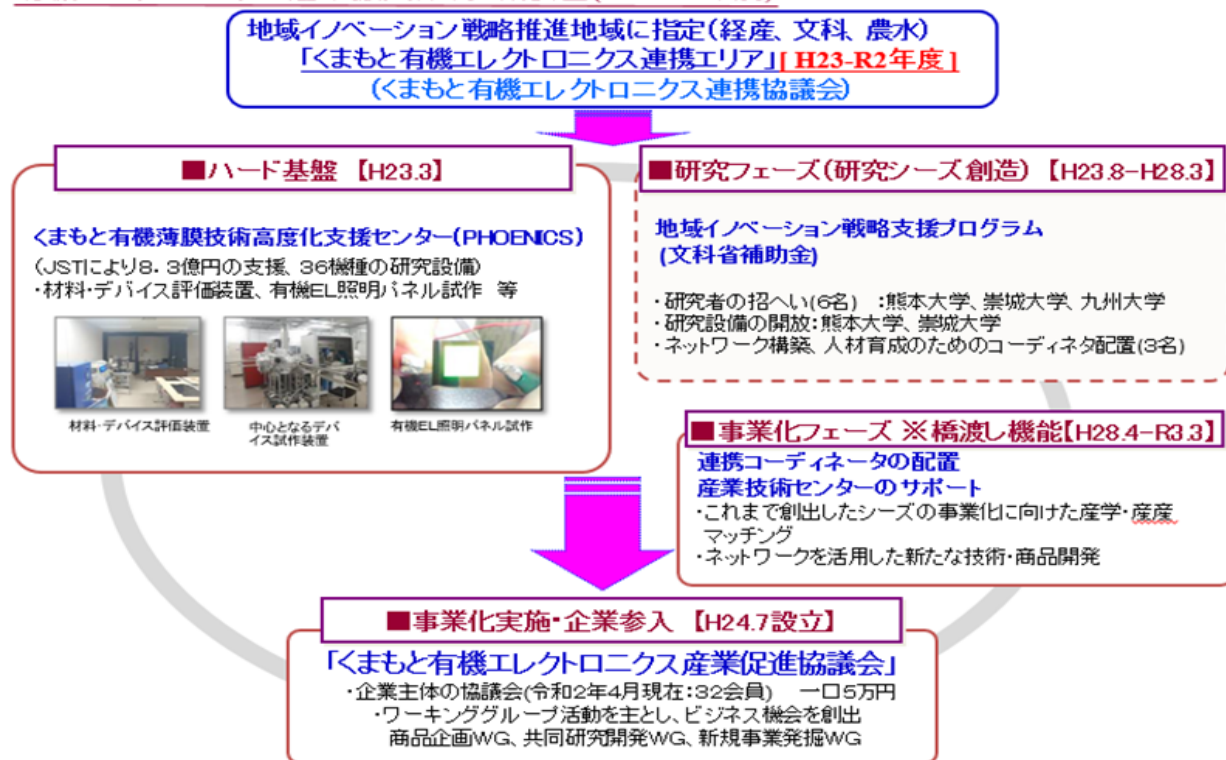


図4 有機エレクトロニクスに関する地域での産学官推進体制

のポテンシャル維持は将来のセンターの優秀な職員採用にも大きくかかわる。ポテンシャル維持のためには、各個人、個人の日ごろの努力が大切であり、それが将来にも繋がり、熊本県の産業支援に直結すると考える。また、“組織が人を創るのではなく、人が組織を創る”ということが重要と考える。その際は、県庁関係各課の協力も不可欠で、国の動向など、新しい情報をキャッチして、産業技術センターと連携しながら、さらなる協力をお願いしたい。

謝辞

本事業の完結に際し、当時の商工観光労働部長の中川芳昭様をはじめ、元産業支援課の田副勝裕様、元産業技術センター所長柏木政弘様、同次長奥菌惣幸様、同技術次長河北隆生様並びに元産業支援課長高口義幸様に深く感謝申し上げます。

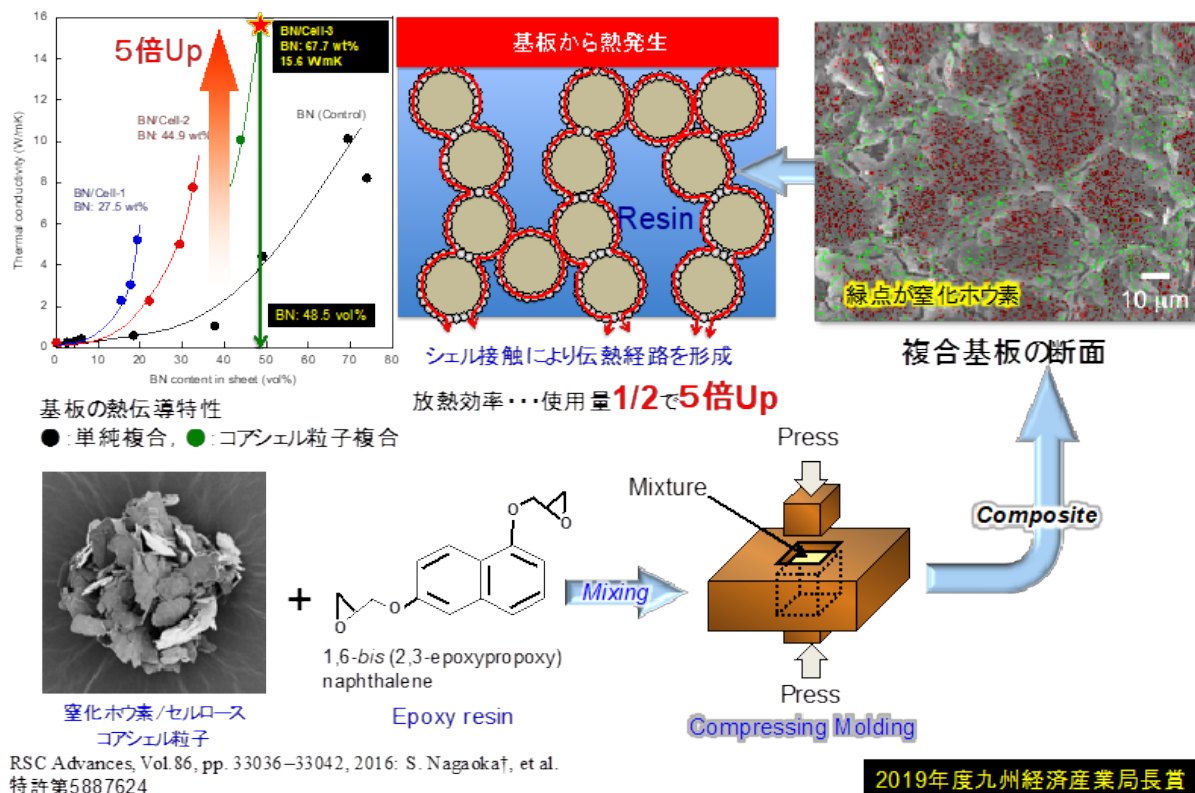
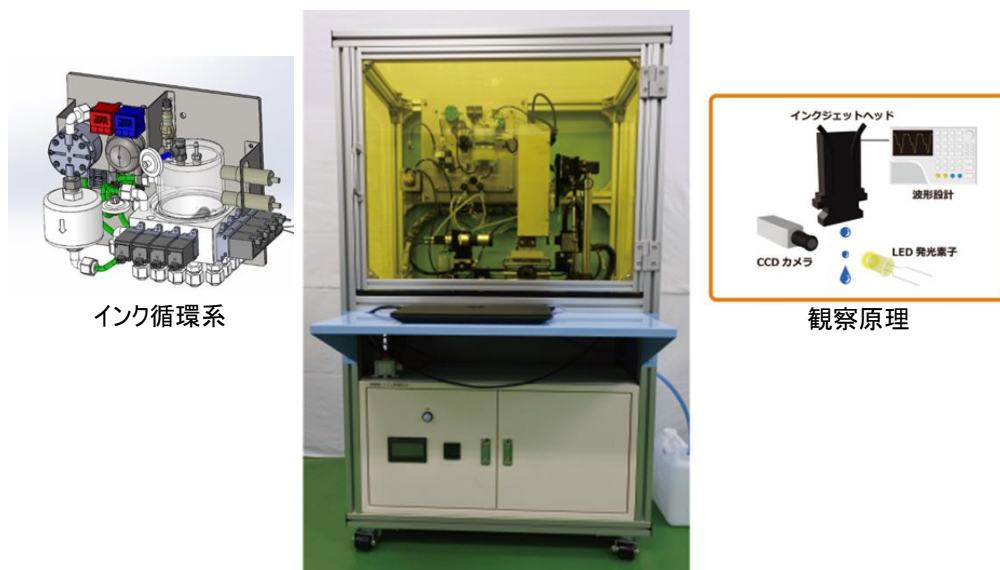


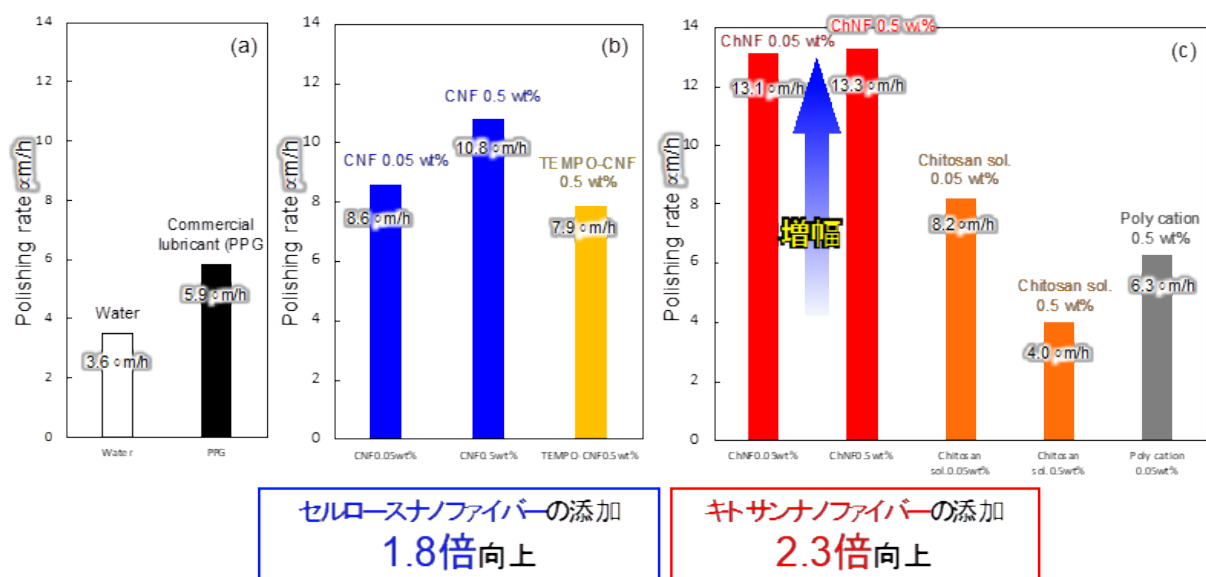
図5 放熱材料の開発(オジックテクノロジーズ、熊本大学、産業技術センター)



- インクジェットの液滴をカメラで計測
- Konica, Kyocera, FujiFilmの装置に対応可

販売実績
1台：800万円

図6 インクジェット装置の実用化事例(KIT-CC)



販売数
SiCウエハ
年間/ニケタ

多糖ナノファイバーを用いることにより、
市販研磨薬剤より、飛躍的に研磨速度をアップ

特許6744611号

濱田重工(株)

図7 パワー半導体錬磨液の共同研究・実用化事例(濱田重工、熊本大学、産業技術センター)

特願2019-003837

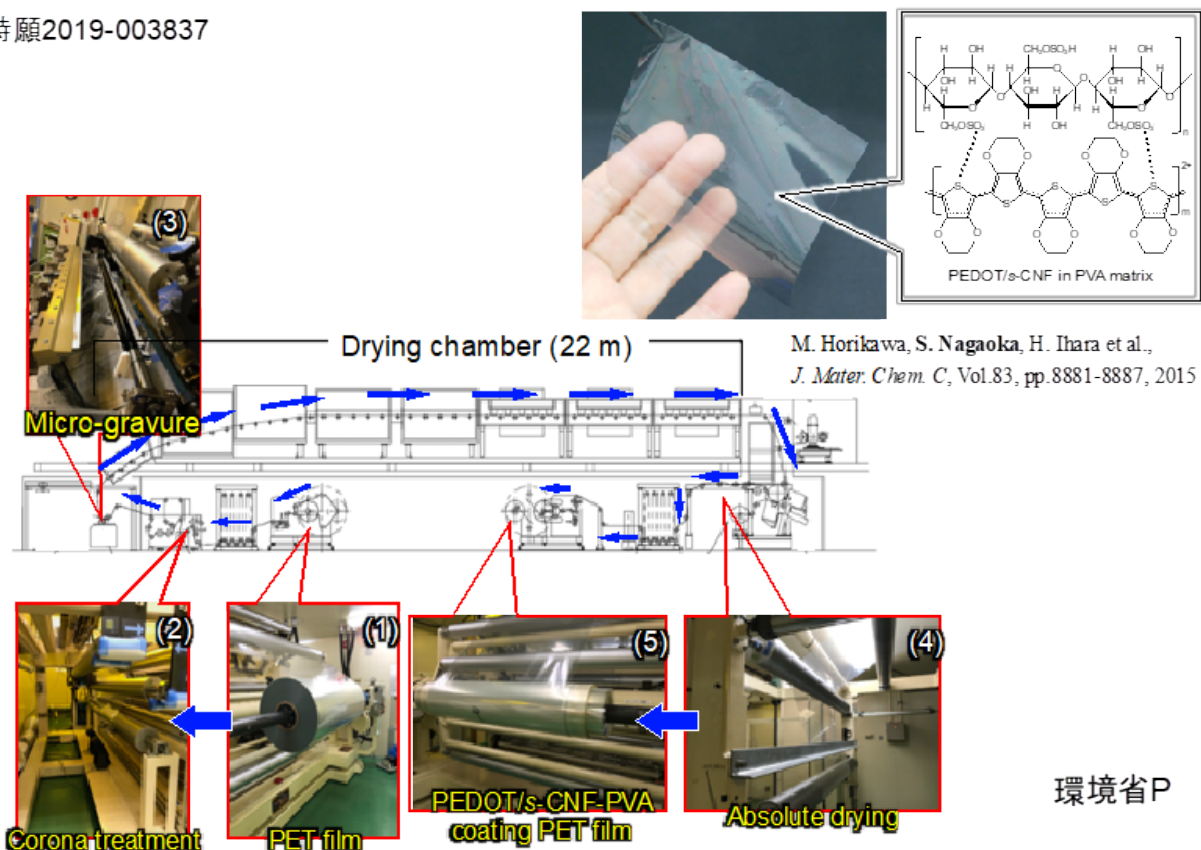


図8 Roll to Roll 成膜技術による PEDOT/CNF 遮光中間膜～環境省プロジェクトにおける成果

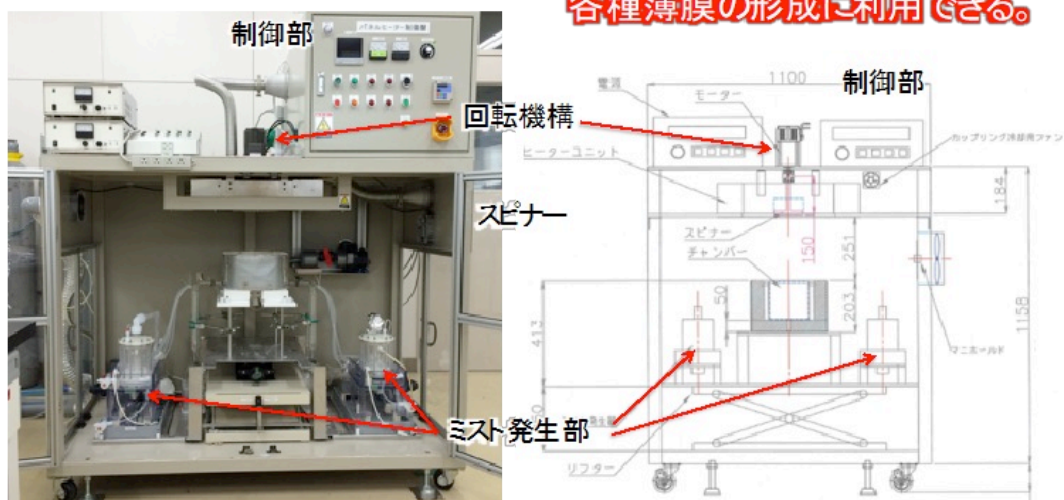


図9 従来にない回転型ミスト CVD 装置の開発(オジックテクノロジーズ、熊本大学、光栄、産業技術センター)



(a) 山鹿灯籠用有機 EL 照明(ヒューマン) (b) 有機EL 棚下照明(テクノ・ラボラトリ) (c) 有機EL 照明(天草池田電気)



(d) 高照度光療法補助器具(ヒューマン) (e) インクジェットマルチプリンター(KIT-CC) (f) 耐震性超軽量照明(サック、オオクマ電子)



(g) 医療用有機 EL コントローラー・WL 発光ユニット(プレアデステクノロジー) (h) 有機EL インテリア照明(オオクマ電子)

図10 県内企業等による有機薄膜関連技術を活用した施策・製品化等の例(抜粋)

編集委員会

委員長	土村 将範
委員	松尾 英信
	渡辺 秀典
	松枝 寛
	前田 和輝
	吉田 恭平
	龍 直哉
	吉川 聡一郎
	田中 亮一

熊本県産業技術センター研究報告 第56号 令和2年度

編集・発行 熊本県産業技術センター

〒862-0901 熊本市東区東町 3-11-38

TEL: 096-368-2101 (代表)

FAX: 096-369-1938

発 行 者：熊本県

所 属：熊本県産業技術センター

発行年度：令和 3 年度