

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04956

研究課題名(和文) 木材および竹パルプ由来新規セルロースナノファイバー形態：セルロース・ナノアネモネ

研究課題名(英文) Cellulose nanoanemone: An asymmetric form of nanocellulose derived from wood and bamboo pulps

研究代表者

近藤 哲男 (Kondo, Tetsuo)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30202071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ACC法とは、試料を含む水流を高速に対向衝突させ、その衝撃波によって、マイクロサイズの物質をナノ微細化する手法である。本研究では、まず、この水中カウンターコリジョン(ACC)法によって木材由来および竹由来のマイクロサイズのパルプという天然セルロース繊維をナノ微細化する際に、セルロース繊維の還元性末端側が優先的に切断する現象を明らかにした。さらに、その選択的割裂により、片側にイソギンチャク様のサブフィブリルを有する非対称な形状を示すナノセルロース、「セルロース・ナノアネモネ」を創製し、その非対称な形状に由来する相互作用から得られる分散水の物性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、再生産可能資源であるセルロース素材から、水のみによる物理化学的手法により、独特の形態と特性を示す非対称セルロースナノファイバーを創製し、その機能材料としての可能性を新たに見出したものである。この成果は、セルロースナノファイバーの有用性を新たな観点から示す。同時に、本研究における生物材料をナノ化する際に形状に異方性や非対称性を与えることにより、独特の物性を示すようになるという知見は、学術的には発展著しいソフトマター分野を含む生物材料設計学に新たな方向性を与える。

研究成果の概要(英文)：Nanocellulose, which attracts increasing attention in basic research and for use in advanced materials, is usually considered to have a symmetrical nanofibril, nanorod or fibrillated nanofiber shape, regardless of the asymmetric effects owing to the presence of one reducing end. The production of asymmetrical nanocellulose would considerably extend its usefulness in new applications. We produced an asymmetric cellulose nanofibril with a shape that changed from a thick nanobarrel at one end to a thinner cylinder with a few flourishes towards the reducing end. The “cellulose nanoanemone” fibrils, named after sea anemone, were fabricated by aqueous counter collision of bacterial cellulose pellicle cultured under dissolved oxygen conditions. The characteristics of the “cellulose nanoanemone” fibrils were determined both in the dry and the in situ water-dispersed states by selective staining of the fibrillated ends in a single nanofibril by using confocal laser scanning microscopy.

研究分野：農学

キーワード：セルロース セルロース・ナノアネモネ 竹セルロースナノファイバー バクテリアセルロース 水中カウンターコリジョン(ACC)法 タイムラプス共焦点走査型レーザー顕微鏡観察

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 1. 研究開始当初の背景

自然界において、ナノサイズの物質を緻密に組み上げることにより、生物の営みに必要な物性を示す構造体が構築される。代表的なナノサイズの物質(ビルディングブロック)として、ナノファイバーが挙げられる。植物細胞壁では、幅約 3-4 nm のセルロースナノファイバーが集合体となってマイクロサイズのマイクロフィブリルを形成し、配向しながら堆積しており、植物の幹や茎に高い強度を与える。木材に限らず、草や竹といった草本類のほか、酢酸菌などの微生物、ホヤといった海産動物などによって産生されるセルロースは、分子レベルでは「セルロース」という共通の構造を有するが、その集合構造、階層構造が異なるために様々な形態や機能を示す。同じ植物でも、ナノからマイクロサイズへのファイバーの形成プロセス(木質化)は、木本と竹などの草本とは異なる。

植物細胞壁中のセルロースファイバーは、産業的には物理化学的脱リグニン処理によりパルプとして取り出される。この紙の原料であるマイクロサイズの幅を有するパルプを、ナノサイズにまで微細化することでセルロースナノファイバー(以下 CNF)を近年比較的容易に得ることができるようになり、世界的に注目を集めている(文献1)。CNF 形態は、大別するとナノクリスタル、ナノファイバー、マイクロフィブリル化ナノファイバーに大きく分けられ、それぞれの形態は、ナノ微細化法の違いによって決定される。

ナノ微細化手法を大別すると「化学的手法」と「物理的手法」の2つに分類される。研究代表者らは、これまでに対向するノズルから高圧高速で噴出する試料懸濁水の水流衝突を利用した、「水中カウンターコリジョン(Aqueous Counter Collision)法」(以下 ACC 法)と呼ばれる、水だけを用いる物理的手法を用いた生物材料のナノ化を検討してきている。

ACC 法によるナノファイバー製造法は、研究代表者が世界に先んじて独自に提案したものであり、追従を許していない。そこで本申請において、さらに ACC 法を深化させ、「木材および竹パルプを特定条件で ACC 法処理することにより、新規ナノファイバー形態である『セルロース・ナノアネモネ』というユニークなシングルナノファイバー形態が得られないかという発想」に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、木材および竹パルプを原料として、ACC 法による「セルロース・ナノアネモネ\*」の創製を検討する。次に、アネモネ触手が、もともとの CNF の性質にどのように影響するのかを吸着特性を中心に解析する。さらに、アネモネ触手先端(還元性末端)に化学的に特定の極性基を導入して、さらなる機能化をめざす。すなわち、アネモネ触手の還元性先端(アルデヒド集積場)を反応場として機能性官能基の導入を検討し、分子レベルの官能基がナノアネモネ片末端に集積されることによる新規 CNF の機能の発現の検討を行う。

\* 「セルロース・ナノアネモネ」とは： ACC 法で処理すると、独特なイソギンチャク状のサブフィブリル(ナノアネモネ触手)が出現した。本研究では、この現象に着目する。この形態は、これまでのセルロースナノファイバー(CNF)には見られない新規形態であり、「セルロース・ナノアネモネ」と以降呼ぶことにする。

## 3. 研究の方法

(1) ACC 法による木材および竹からのナノアネモネ化は可能か?そして、ナノファイバーの還元性末端から優先的に生ずるか?

一般に天然セルロース繊維は、セルロース分子鎖が同方向に平行に配列するため、両末端の性質が異なり、それぞれ還元性末端と非還元性末端をもつ。また、微生物由来のセルロース原料を高速で対向衝突させる水中カウンターコリジョン(ACC)法に供すると、衝突回数に応じて繊維がナノアネモネ化することが見出されている。

そこで、まず、木材および竹からのセルロース・ナノアネモネ創製のための ACC の処理条件の検討を行った。すでに見出されている酢酸菌の溶存酸素培養で得られる「準安定なセルロースナノファイバーペリクル」に比べ、木材および竹由来のファイバーが ACC に対し安定なことから、前処理も考慮に入れた条件を検討した。次に、ナノアネモネ化がファイバー還元性末端から進行するかどうかについて還元性末端選択的な銀ラベル化(還元性末端の Ag ナノ粒子(NPs)修飾を施し、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて可視化することによって検討した。

(2) セルロース・ナノアネモネ中のイソギンチャク状触手における還元性末端の化学修飾の試みとして、ベンゼン環の導入を検討した。原料としては、酢酸菌由来のセルロースをモデル原料として用いた。酢酸菌を通常の培養および溶存酸素下条件で培養することにより得られたペリクルを ACC 処理(200 MPa, 30 pass)に供し、0.01% (w/w)ナノファイバー分散水を調製した。多糖の還元性末端にフェニル基を導入するため、30 mL の分散水に対して 0.15 mL のフェニルヒドラジンを加え、70 °C、24 時間振とうののち、得られた試料を超純水によって洗浄した。この試料をタンパク質であるカゼインが含まれる水酸化ナトリウム水溶液に加え、紫外(UV)吸光度測定を行い、導入の有無を検討した。

(3) 得られたセルロース・ナノアネモネ中のイソギンチャク状触手における還元性末端に導入

されたフェニルヒドラジンを蛍光プローブとし、共焦点走査型レーザー顕微鏡によるタイムラプス観察から、セルロース・ナノアネモネの水中における動態挙動を可視化するとともに、運動速度を解析した。

(4) 上記の分散水に対し、粘弾性挙動を検討した。

#### 4. 研究成果

本研究では、セルロースナノファイバーの新たなナノ構造形態として、非対称セルロースナノファイバー「セルロースナノアネモネ」を提唱し、その物性を検討した。

- (1) まず、セルロース試料の懸濁水を高速で対向衝突させ、その衝撃波による界面破壊が天然セルロース繊維のナノ微細化を誘発する ACC (水中カウンターコリジョン) 法では、繊維両末端の還元性の有無の違いに起因して、選択的に還元性末端から生じることを明らかにした。
- (2) 溶存酸素下での酢酸菌の培養で得られるセルロースナノファイバーのゲル状膜が、準安定なセルロース I 結晶構造を多く含むことに着目し、これを原料として、異方的なナノ微細化を誘発させる ACC 法を適用させた。その結果、片末端がさらに顕著にフィブリル化し、反対末端が全くフィブリル化していない非対称なセルロースナノファイバーが得られることを発見している。このナノファイバー形状がイソギンチャクに類似していることから、「セルロースナノアネモネ」と名付け、同上の透過型電子顕微鏡観察の結果、このフィブリル化した末端もセルロースの還元性末端側に存在することを確認した。
- (3) さらに、水中での繊維存在形態を明らかにするため、フィブリル化した枝部の還元性末端を蛍光分子で化学修飾し、共焦点レーザー顕微鏡によりその動的挙動をタイムラプス動画によりモニターしている。その結果、顕著なブラウン運動が認められ、その挙動から流体力学直径を算出・評価したところ、水中でもセルロースナノアネモネは枝部を広げて存在していることを明らかにした。
- (4) 最後に、その分散水の粘弾性挙動について、繊維同士の相互作用に由来するチキソトロピー性発現の観点から検討した。セルロースナノアネモネ分散水は、チキソトロピー性を示し、せん断ストレスを負荷するごとに通常現れる零せん断粘度の低下はみられず、初期値が維持されることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宇都宮ひかり、近藤哲男
2. 発表標題 水中でナノ触手を広げるACC-セルロースナノファイバー：ナノアネモネ
3. 学会等名 セルロース学会第25回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇都宮ひかり、近藤哲男
2. 発表標題 ユニークな形態を有したセルロースナノファイバー “セルロースナノ・アネモネ” の物質吸着能
3. 学会等名 第54回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇都宮ひかり、近藤哲男
2. 発表標題 水中カウンターコリジョン法によって創製された触手型還元性末端を有するセルロースナノファイバー “セルロースナノ・アネモネ”
3. 学会等名 セルロース学会第24回年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Utsunomiya, H. and Kondo, T.
2. 発表標題 “Cellulose nano-anemone” having fibrillated reducing ends as an anisotropic cellulose nanofiber fabricated by the aqueous counter collision
3. 学会等名 5th EPNOE International Polysaccharide Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Utsunomiya, H. and Kondo, T.
2. 発表標題 “Cellulose nano-anemone” as a Janus nanofiber having nano-tentacles
3. 学会等名 4th International Cellulose Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇都宮 ひかり、近藤 哲男
2. 発表標題 “セルロースナノ・アネモネ” - 水中カウンターコリジョン法によって創製された異方性を有するセルロースナノファイバー -
3. 学会等名 セルロース学会第23回年次大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考