

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450251

研究課題名(和文) 酵素処理と機械的処理による高アスペクト比のタケマイクロフィブリルの単離とその応用

研究課題名(英文) A study on some composites of some polysaccharide/Bamboo nano-cellulose produced by mechanical processing with enzymatic treatment.

研究代表者

林 徳子 (Hayashi, Noriko)

国立研究開発法人 森林総合研究所・きのこ・微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：20353815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：セルラーゼ(エンドグルカナーゼ)と機械処理併用によりタケパルプを処理すると、マイクロフィブリルまでほぐすことができる(タケCNF)。タケCNFはグルコース等グルカン80%、キシラン20%から成り、NMRや高速AFMの分析から表面にキシランが存在することが明らかになった。キシランが存在することで1%以下の濃度でもゲル化しやすい。このようなタケCNFについて、寒天と混合してフィルム化すると、タケCNFが寒天中に分散し、セロハン程度の強度を持つフィルムが得られた。コーンスターチ、カラギーナンと混合したところ、成形性がよくなり自立するゲルを得た。このゲルは付着性が悪く、脆かった。

研究成果の概要(英文)：We treated Moso pulp by mechanical treatments such as the ball milling with water in the presence of endoglucanase (EG), a kind of cellulase. This treatment disrupted the cohesive bonds between individual cellulose microfibril effectively and produced nano-fibers (Take CNF). The Take CNF should be covered with xylan. The film contained agar and take CNF showed the almost strong as cellophane. The composite gel contained cornstarch and take CNF showed not same as the cornstarch only.

研究分野：セルロースの酵素加水分解物性

キーワード：セルロースマイクロフィブリル セルラーゼ 湿式粉碎 増粘多糖類 破断強度

## 1. 研究の背景

### (1) タケ利用の現状

日本のタケ資源の蓄積量は約 1600 万トンと推定されているが、そのほとんどが小規模な民有林で荒廃するまま放置されている。また、タケは東南アジア、中南米、アフリカ等にも広く分布し、その多くが未利用である。従って、潜在的資源量は多く、高付加価値マテリアルへの利用開発が期待される。

タケ材は、水の通導する道管の周辺にある維管束鞘とその周囲の柔細胞からなり(図 1)

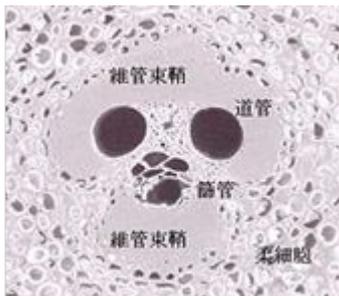


図 1 竹の組織

その化学成分は木材に類似する<sup>1)</sup>。維管束鞘には「天然のガラス繊維」とも言われる高強度の繊維が含まれる。しかし、凝集した維管束鞘やリグニンの存在により、繊維の単離が困難で、かつ成分利用が難しい材料とされてきた。現在、タケ繊維は爆破法、機械処理法、アルカリ蒸解法によって分離され、樹脂と混練することで強化プラスチックとして利用されているが、繊維幅は 10 - 400  $\mu\text{m}$  で、ナノサイズの利用に至っていない。

### (2) セルロースナノファイバー

近年、情報通信、環境、ライフサイエンス等様々な分野でナノテクノロジー研究が進み、ナノサイズ特有の物質特性を用いて従来の製品の小型化や新機能の付与が行われている。ナノ素材としてファイバーやウィスカーなど様々な形態の材料が開発されている。セルロースも天然のナノファイバーである。セルロースは、植物、海藻、微生物などが 3-20nm 径、 $\sim 1\mu\text{m}$  長のマイクロフィブリル (CMF) の形で生産し、直鎖状のセルロース分子鎖が互いに緊密に結合して複雑な高次構造を形成し、分子鎖の配向した部分は結晶性を示す。この構造は、CMF にしなやかでありながら高強度な材料特性を与えることから、ナノフィラーとしてプラスチック等の補強材への利用が期待されている。特に、フィンランドを始めとする北欧諸国では、パルプからのナノファイバー実用化研究が進行するなど、セルロースナノファイバーはバイオリファイナリーの一環として世界中から注目されている。

現在、セルロースナノファイバーは、酸加水分解法で生産されるセルロースナノ結晶 (CNC, 5-70nm 径、非晶領域が分解されて結晶領域のみ残るロッド状)、機械的解繊法で生産されるマイクロフィブリル化セルロース (MFC, 5-60nm 径、強力な剪断力により CMF 間を破壊し、繊維が絡み合うネットワーク構

造)、さらに酢酸菌が生産するバクテリアナノセルロース (BNC) に分類される<sup>2)</sup>。ナタデココとして食用にも供される BNC は、20-100nm 径、6-12 $\mu\text{m}$  長のセルロースナノファイバー (アスペクト比: 220-450) が絡み合っ て強固なゲル状を呈する<sup>3)</sup>。セルロースゲルの多くは誘導体化セルロースを用いるが、再生セルロース由来の透明セルロースゲルも報告されている<sup>4)</sup>。最近のセルロースナノファイバーの利用研究では、ハイドロゲルやエアロゲル、金属などの無機物との複合材料等新規ナノ素材の開発が進められており、セルロースナノファイバーの物性を生かした材料設計はさらに重要性を増している。

## 2. 研究の目的

本研究は健全な竹林育成のためのタケ利用の一環として、タケセルロースマイクロフィブリル (タケ CMF) を環境負荷の低い方法で単離するとともに、新規材料開発を提案することを目的とする。即ち、アルカリ処理で得たタケパルプから機械的処理とセルラーゼ処理の同時処理により高アスペクト比の CMF を単離し、配向化、ハイドロゲルとしての利用、あるいは他の多糖類と複合してグリーンナノコンポジットを創製する。また、タケ CMF はタケノコのそれとほぼ同じ性状を有すると推定されることから、嚙下補助のための増粘剤等食品添加物への応用展開を図ることが可能である。本研究では、そのための基礎的な実験を行う。

我々は、機械処理と酵素処理を同時に行う温和な条件でのセルロースナノファイバー化法を考案した<sup>5)</sup>。また、機械処理条件を変えることで、繊維の長さ制御が容易に出来る事も見出した<sup>6)</sup>。本方法は、機械処理によるナノファイバー生成法の前処理として用いられる酵素処理とは異なる。即ち、機械処理により CMF 間に割れが発生するとほぼ同時に酵素が作用して解繊が進むため、比較的容易に CMF 1 本ずつを傷めずに取得できる。従って、得られる CMF は酸加水分解法と機械処理法の間の特徴を持つと考えられる。

本研究は、以下に述べるような点で、これまでの研究をさらに進めるものである。

(1) 材料設計上、CMF のアスペクト比は重要なファクターである。本方法で高アスペクト比の CMF が得られるのは、タケに起因するのか、酵素の作用に起因するのか。タケ CMF の物性解明は、余り知られていないタケ材の微細構造の解明につながり、ナノ素材として使用するために必須の基礎データとなる。

(2) タケ CMF とゲル形成能を持つ他の多糖類と複合ゲルを考案する。セルロースを骨格にして他の多糖類で架橋するという植物に倣ったグリーンナノコンポジットが調整できる。

(3) セルロースは不溶性食物繊維である。セルロースの摂取は、大腸癌発生抑制など成人病予防に役立つとされており、セルロースナノファイバーの食分野への研究展開も重要であると考えられる。現在、増粘剤、乳化剤などに、結晶セルロースや誘導体化セルロースが用いられている。結晶性セルロースは約 50  $\mu\text{m}$  径と大きいため、舌触りが悪く、多く食することはできない。セルロースのナノファイバー化により滑らかさが生じ、食品添加剤への展開が可能になる。

(4) タケの成熟は約 5 年と短いため、材料の確保が容易である。また、タケ材の利用は健全な竹林育成に役立ち、ひいては二酸化炭素固定にも寄与する。

### 3. 研究方法

(1) 高アスペクト比のタケ CMF 単離条件の最適化

本処理に用いるセルラーゼは非晶領域に作用するエンドグルカナーゼが適すると考えられるが<sup>7)</sup>、酵素使用量や機械処理条件などを検討することにより高歩留りの CMF 精製条件を明らかにする。機械処理と酵素処理の同時処理で歩留りよくナノファイバーを形成する条件を検討する。

(2) 単離したタケ CMF の微細構造解析およびゲル形成機構の解明

上記で得られたタケ CMF の物性を明らかにする。また、形成されたハイドロゲルについてもその形状等からゲル形成機構を明らかにするとともに、その物性を明らかにする。上記の CMF の物性を電子顕微鏡 (TEM、SEM)、原子間力顕微鏡 (AFM)、X 線解析、赤外分光分析、ラマン分析、示差走査熱量分析装置 (DSC) 等を用いて分析する。また、CMF の配向化、ハイドロゲルの構造について電子顕微鏡、DSC、粘弾性分析を行い、その形成機構を明らかにする。

(3) 他の多糖類との複合フィルム、ゲルの生成

ハイドロゲルを用いた CMF の配向化、あるいは CMF と他の多糖類との複合ゲルを作成し、その物性を明らかにする。キサンタンガム等ガラクトマンナンと複合ゲルを作成し、ゲルの性状について熱的挙動、粘弾性分析などを行う。

### 4. 研究成果

(1) 高アスペクト比のタケ CMF 単離条件の最適化

我々は、機械処理と酵素処理を同時に行う温和な条件でのセルロースナノファイバー (CNF) 化法を考案し、機械処理条件の変えることで、生成する CNF の長さ制御が可能なる

ことを見出した。そこで、我々は、モウソウ

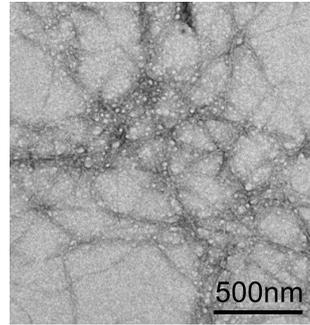


図 2 超音波破砕・攪拌処理時に EG を投入して得られた CNF の TEM 写真。

チクを用いて、アルカリ処理により脱リグニンしてパルプ化した後、1-5%のパルプ懸濁液 200 mL について、機械処理として超音波処理 2 時間後 1 日攪拌の処理を 2-3 回繰り返す。同時にセルラーゼ (ファミリー 45 に分類されるエンドグ

ルカナーゼ ; (EG) ノボザイムス社提供の液体) を 1-2 mL 加えることにより、1-数本のセルロースマイクロフィブリルで、長さ  $1\mu\text{m}$  程度の繊維を単離した (図 2、3)。また、得られた CMF の水懸濁液が 1% 以下の低含有率でも半透明なハイドロゲルを形成することを見出した。この CMF は、高結晶性、高アスペクト比、負の表面電荷がパルプよりも大きいことが特徴で、タケからのこのサイズの CMF の単離は未だ報告されていず、ナノマテリアル素材として利用開発の可能性を示唆した。

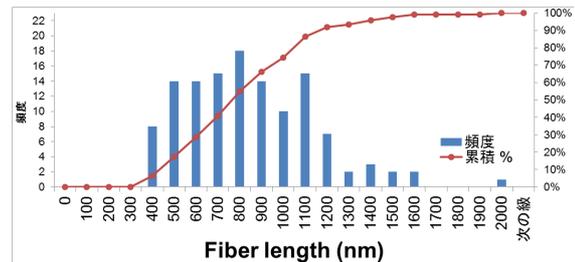


図 3 図 2 で生成したセルロースマイクロフィブリルの長さの分布

また、CMF を懸濁する溶媒を水あるいは酢酸バッファー (pH6) で比較したところ、水の方が CMF の長さが若干短く、得られた CNF 懸濁液は 1% 以下の濃度でも半透明のゲルを形成しやすいことが判明した。

(2) 単離したタケ CMF の微細構造解析およびゲル形成機構の解明

得られたタケゲルの動的粘弾性測定結果

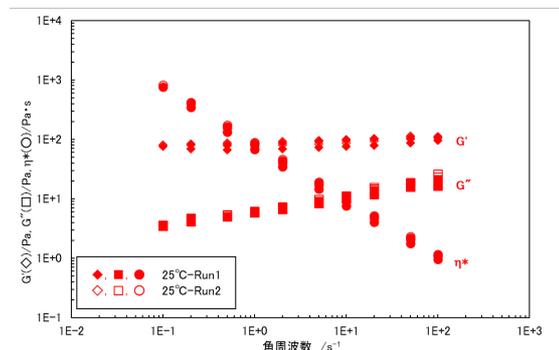


図 4 タケゲルの動的粘弾性測定値

を図4に示す。G'がG''よりも測定周波数の範囲において常に大きいことから、固体としての性質を示すことが分かった。

タケCMFの糖組成は、アルカリ処理パルプでは、グルコース85-87%、キシロース13-15%、アラビノース0.4%であった。一方、CNFでは、グルコース78-80%、キシロース15-18%、アラビノース2-3%、ガラクトース2-4%、マンノース1-2%であった。

このCNFについて、NMRや高速AFMの分析から表面にキシランが存在することが明らかになった。キシランが存在することで1%以下の濃度でもゲル化しやすいと考えられる。即ち、ゲルをキシラナーゼで処理すると、フレーク状に壊れる現象が見られた。従って、このゲル形成にはキシランが大きく関与することが示唆された。表面にキシランが多いことから、それらが接着成分の様に作用して、自己組織化したCMFとの相互作用によりゲル状になると考えられる。

タケCMFのゲルは寒天ゲルとくらべて脆く、それでも固体の性質を示す。多糖類がこのような性質を示すことは、多糖類ゲルに特有の現象であるが、CNF由来のゲルはチキソトロピー性に起因するさっぱりした粘性があることから、介護食用への可能性が示された。

### (3) 他の多糖類との複合フィルム、ゲルの生成

タケCMFゲルを他のプラスチック素材に挟み込み、せんだん力を加えると、配向化できることを確認した。

また、このようなタケCMFについて、寒天と混合してフィルム化すると、タケCMFが寒天中に分散し、セロハン程度の強度を持つフィルムが得られた(図5)。

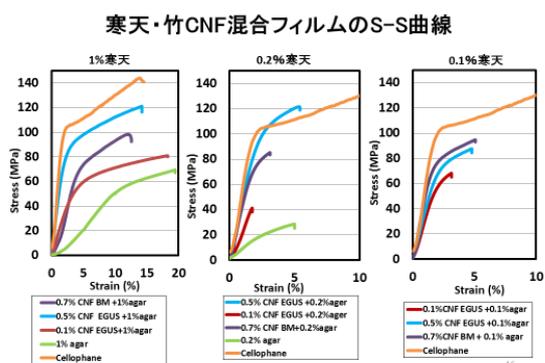


図5 寒天とCMFの混合ゲルから調整したフィルム強度

食品にも利用できるようにするため、アスペルギルス由来の食品用セルラーゼを用いて、湿式粉碎であるピーズミルを用いてナノ化し、得られたセルロースナノファイバー(CNF)について、コーンスターチ、ゼラチン、コンニャクマンナン、キサンタンガムと混合した。コーンスターチについては成形性がよくなり自立するゲルを得た。このゲルは付着性が悪く、脆かった。このような複合ゲ

ルにおいてもCNFのチキソトロピー性に起因する粘性の相違が発現することが確認できた。

### 【参考文献】

- 1) 金ら、木材学会誌 54(1)、33-38、2008
- 2) Clemm D. et al., Angew. Chem. Int. Ed. 50, 5438-5488, 2011
- 3) 松本考芳「コロイド科学のためのレオロジー」p.79-83、丸善株式会社 2003
- 4) 小野博文「セルロース利用技術の最先端」磯貝明監修、p.289-297、シーエムシー出版 2008
- 5) 渋谷、林「セルロースナノファイバーとその製造方法」特開 2008-15719
- 6) 林、渋谷、鈴木、池田、繊維学会予稿集 2012 67(1)、346、2012
- 7) 林、渋谷、戸川、セルロース学会第18回講演要旨集、152、2011

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 5 件)

林徳子、下川知子、池田努、真柄謙吾、久保智史、戸川英二「竹由来のセルロースナノファイバーと他の多糖類との複合化」、平成27年度繊維学会、2015.6.11、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Noriko Hayashi, Tomoko Shimokawa, Tsutomu Ikeda, Hajime Shibuya, "Effect of hemicellulose in bamboo cellulose nano-fiber produced by mechanical processing in the presence of endoglucanase.", ISF(国際繊維シンポジウム)2014.9.29、東京ビッグサイト東京ファッションタウンホール(東京都江東区)

林徳子、下川知子、池田努、鈴木養樹「機械処理・酵素加水分解併用により生成するタケナノファイバーとカーボンナノチューブの複合化」、平成26年度繊維学会、2014.6.11、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

林徳子、下川知子、池田努、野尻昌信、「ナノファイバー化したパルプにおけるヘミセルロースの影響」、セルロース学会第20回年次大会、2013.7.19、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ(京都府宇治市)

林徳子、下川知子、池田努、「パルプのナノファイバー化におけるヘミセルロースの影響」、平成25年度繊維学会、2013.6.12、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 徳子 (HAYASHI, Noriko)  
国立研究開発法人森林総合研究所・きの  
こ・微生物研究領域・主任研究員  
研究者番号：20353815

(2) 研究分担者

下川 知子 (SHIMOKAWA, Tomoko)  
国立研究開発法人森林総合研究所・きの  
こ・微生物研究領域・主任研究員  
研究者番号：60353728