

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380102

研究課題名（和文） TEMPO 触媒酸化多糖の機能および構造解析

研究課題名（英文） Studies on functionalities and structures of TEMPO oxidized polysaccharides

研究代表者

磯貝 明（IAOGAI AKIRA）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：10191879

研究成果の概要：2,2,6,6-テトラピペリジニル-1-オキシラジカル（TEMPO）を触媒量用いる水系媒体での、セルロースを含む多糖の酸化改質について詳細に検討した。新しく開発した亜塩素酸ナトリウムを主酸化剤とする弱酸性～中性条件での TEMPO 触媒酸化を、天然セルロース、レーヨンあるいはセルロースビーズのような再生セルロース、その他の多糖類について適用した。その結果、脱離反応による低分子化が抑えられるために、天然セルロースの酸化・水中解繊処理では、高分子量でアスペクト比の大きい TEMPO 酸化セルロースナノファイバーが得られた。木材セルロースから得られたナノファイバーは幅が 4～5nm で、長さは数ミクロン以上あり、新規 TEMPO 酸化セルロースナノファイバーの調製方法として確立することができた。天然セルロースをボールミル粉碎して非晶化した場合には、水溶性のポリウロン酸であるセロウロン酸が得られた。一方、レーヨン繊維の亜塩素酸ナトリウム系 TEMPO 触媒酸化でも、水溶性のセロウロン酸が得られたが、その分子量は従来法の 6 倍以上となり、化学構造も均一であった。再生セルロースビーズに亜塩素酸ナトリウム系 TEMPO 触媒酸化を適用したところ、元の多孔質、ビーズ形状を保ったまま、その表面に高密度でカルボキシル基を導入することができた。その TEMPO 酸化セルロースビーズは、既存のカルボキシメチル化ビーズよりも、高い金属イオン吸着能、カチオン性高分子吸着能を示し、新しい分離用アニオン性セルロースビーズの開発につながるデータを得ることができた。再生セルロースでもレーヨンのようにセロウロン酸が得られる場合と、セルロースビーズのように固体表面のみにカルボキシル基が導入される場合があり、全く異なるがこれは両者の固体構造を反映している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
18年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
19年度	3,300,000	990,000	4,290,000
20年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・木質工学

キーワード：環境材料、ナノ材料、糖、多糖、触媒酸化

## 1. 研究開始当初の背景

バイオマスの有効利用のためのブレイクスルー技術が求められているなかで、当 TEMPO 触媒酸化反応は、水系媒体で多糖の1級水酸基を位置選択的に、常温常圧で酸化してカルボキシル基に変換できる特徴があるため、新しいバイオマス多糖の改質方法として基礎研究を進める必要があった。

## 2. 研究の目的

これまでの多糖の TEMPO 触媒酸化研究で蓄積された成果を発展させ、その反応の優位性と、従来にない特異的な酸化生成物が得られるという特徴を生かしながら、TEMPO 触媒酸化反応の改良によって更なる環境対応プロセスの検討を行い、得られる水溶性ポリウロン酸類あるいは表面化学改質した多糖の機能評価と、関連する構造・物性解析等の基礎研究を進め、同時に生物分解性、生体安全性など生物化学的特性を明らかにし、TEMPO 触媒酸化多糖をバイオ系新規機能材料として利用するための知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

新規 TEMPO 触媒酸化法の構築：環境低負荷型の新しい TEMPO 触媒酸化反応システムの構築を目指す。

多糖の TEMPO 触媒酸化による透明ナノフィブリル分散液の調製：各種セルロースおよびキチン等について、温和な条件で TEMPO 触媒酸化を行い、続いて簡単な攪拌処理によって、マイクロフィブリル単位で水に分散した高粘度透明液体を調製する条件を詳細に検討する。得られた試料について、導入されたカルボキシル基量等を測定し、ナノフィブリル分散液形成に必要な条件を明らかにする。更に、得られたナノフィブリル分散液の流動特性、保水性、乾燥によるフィルム形成、フィルムの強度特性・光学特性・物質分離特性、他の水溶性多糖・合成高分子との相溶性等の基本特性を明らかにする。

TEMPO 触媒酸化多糖ナノフィブリルの構造解析：調製したフィブリル状天然セルロース・キチン透明分散液について、導入したカルボキシル基の鉛イオン等に変換し、透過型電子顕微鏡によってマイクロフィブリルレベルでのカルボキシル基の分布状態の解析を行う。

TEMPO 触媒酸化多糖の生分解機構の解明：土中細菌あるいは市販の粗酵素セルラーゼから、水溶性ポリウロン酸類を分解する酵素を単離・精製し、分解物を NMR、多角度光散乱・UV・溶質排除クロマトグラフィー

等によって構造解析し、ポリウロン酸類の生分解機構を解明する。

## 4. 研究成果

亜塩素酸ナトリウムを主酸化剤とする中性～弱酸性水溶液中での TEMPO 触媒酸化反応について詳細に検討し、従来の pH10 で次亜塩素酸ナトリウムを主酸化剤とする TEMPO 触媒酸化と著しい差異が判明した。再生セルロースであるレーヨン繊維に適用したところ、重合度の極めて高いセロウロン酸が得られた。再生セルロースピースに適用したところ、その多孔質、フィブリル構造を維持しながら表面に高密度でアニオン基を導入することができた。天然セルロースに適用したところ、高分子量でアスペクト比の大きい TEMPO 酸化セルロースナノファイバーが得られた。カードラン（ $\alpha$ -1,3-グルカン）に適用したところ、重合度 1,000 程度の高分子量、高粘度ポリウロン酸が得られた。

各種天然セルロース、キチンの TEMPO 触媒酸化・水中解繊処理によって得られる新規バイオ系ナノファイバーの調製条件、未解繊部分の効率的除去方法、効率的解繊方法、得られたゲルの粘弾性特性等を明らかにした。また、残存アルデヒド基量と重合度、解繊性との関連についても明らかにした。解繊・ナノ分散には 1.0mmol/g 以上のカルボキシル基の導入が必要であった。TEMPO 酸化セルロースナノファイバー/水分散液からキャストあるいは過により製膜したフィルムの強度、弾性率、透明度、酸素ガス透過度等を測定し、高い強度、低い酸素透過度（高い酸素バリア性）、著しく低い熱膨張率が得られた。全ての要因を説明することができる段階ではないが、生分解性のあるハイガスバリア高機能包装部材としての高いポテンシャルを示していた。

TEMPO 酸化した各種起源の異なるセルロース試料について、layer by layer 剥離処理による固体結晶セルロース表面の構造解析を行った。その結果、TEMPO 酸化処理・アルカリ抽出処理によりホヤセルロースの結晶表面から一層づつセルロースシートを剥離することが可能となり、従来から提案されているセルロース結晶構造を支持する結果が得られた。一方、リンターセルロースのような高等植物セルロースについては、結晶表面にゲル層が存在していて、TEMPO 酸化・アルカリ抽出処理で剥離しても結晶サイズは変わらないという新しい知見が得られた。これは、高等植物セルロースマイクロフィブリルの表面構造解析に、本手法が適用できることを示している。

再生セルロースの TEMPO 触媒酸化によって得られる水溶性のセロウロン酸の生分解機

構の検討から、土中細菌がセロウロン酸をエンド型およびエキソ型に切断する二種類のリアーゼ型酵素を単離し、生分解機構を明らかにした。また、セロウロン酸を唯一の炭素現としてトリコデルマ菌で培養し、同様のエンド型リアーゼを単離した。そのアミノ酸配列から酵素を生産する遺伝子を酵母に取り込み、大要発現させてエンド型リアーゼの単結晶を得、大型放射光による結晶構造解析からその立体構造、触媒活性部位等を明らかにした。

#### 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)

[雑誌論文](計22件)

Yanagisawa, M., Isogai, A., "Size exclusion chromatographic and UV-VIS absorption analyses of softwood unbleached and bleached kraft pulps using LiCl/1,3-dimethyl-2-imidazolidinone as a solvent", *Holzforschung*, **61**, 236-241 (2007).

Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y., Isogai, A., "Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose", *Biomacromolecules*, **8**, 2492-2496 (2007).

Fan, Y., Saito, T., Isogai, A., "Chitin nano-fibers/whiskers prepared by TEMPO-mediated oxidation of alpha-chitin", *Biomacromolecules*, **9**, 192-198 (2008).

Konno, N., Isogai, A., Habu, N., Iihashi, N., "Purification and characterization of exo-type celluluronate lyase", *Cellulose*, **15**, 453-463 (2008).

Ishii, D., Isogai, A., "Determination of residual amide content in sequentially solvent-exchanged and vacuum-dried cellulose", *Cellulose*, **15**, 651-658 (2008).

Isogai, T., Yanagisawa, M., Isogai, A., "Degrees of polymerization (DP) and DP distribution of dilute acid-hydrolyzed products of alkali-treated native and regenerated celluloses", *Cellulose*, **15**, 815-823 (2008).

Fan, Y., Saito, T., Isogai, A., "Preparation of chitin nanofibers from squid pen beta-chitin by simple mechanical treatment under acid conditions", *Biomacromolecules*, **9**, 1919-1923 (2008).

Hanninen, T. A., Kontturi, E., Isogai, A., Vuorinen, T., "Differences in residual lignin properties between *Betula verrucosa* and *Eucalyptus urogradis* kraft pulps", *Biopolymers*, **89**, 889-893 (2008).

Isogai, T., Yanagisawa, M., Isogai, A., "Degrees of polymerization (DP) and DP distribution of cellulosic acids prepared from alkali-treated celluloses and ball-milled native celluloses by TEMPO-mediated oxidation", *Cellulose*, **16**, 117-127 (2009).

Fukuzumi, H., Saito, T., Kumamoto, Y., Iwata, T., Isogai, A., "Transparent and high gas barrier films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation", *Biomacromolecules*, **10**, 162-165 (2009).

Konno, N., Igarashi, K., Habu, N., Samejima, M., Isogai, A., "Cloning of the *Trichoderma reesei* cDNA encoding a glucuronan lyase belonging to a novel polysaccharide lyase family", *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 101-107 (2009).

Mori, Y., Enomae, T., Isogai, A., "Preparation of pure vaterite by simple mechanical mixing of two aqueous salt solutions", *Materials Sci. Eng. C*, **29**, in press (2009).

Iihashi, N., Nagayama, J., Habu, N., Konno, N., Isogai, A., "Enzymatic degradation of amylouronate (alpha-(1->4)-linked glucuronan) by alpha-glucuronidase from *Paenibacillus* sp. TH501b", *Carbohydr. Polym.*, in press (2009).

Tamura, N., Wada, M., Isogai, A., "TEMPO-mediated oxidation of (1->3)-beta-D-glucans", *Carbohydr. Polym.*, in press (2009).

Fan, Y., Saito, T., Isogai, A., "TEMPO-mediated oxidation of beta-chitin to prepare individual nanofibrils", *Carbohydr. Polym.*, in press (2009).

Konno, N., Ishida, T., Igarashi, K., Fushinobu S., Samejima, M., Habu, N., Isogai, A., "Crystal structure of polysaccharide lyase family 20 endo-beta-1,4-glucuronan lyase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*", *FEBS Lett.*, in press (2009).

斉藤継之, 磯貝 明, "天然セルロースのTEMPO触媒酸化によるセルロースシングルマイクロファイブールの調製", *Cellulose Commun.*, **14**, 62-66 (2007).

磯貝 明, "セルロースナノファイバーの調製

と包装分野への応用の可能性”, *日本包装学会誌*, **16**, 185-190 (2007).

磯貝 明, “ナノファイバー技術による新しい文化・産業の創生”, *機能紙研究会誌*, **46**, 3-12 (2008).

磯貝 明, “パルプ繊維の化学的および機械的改質手法とその効果”, *紙パ技協誌*, **62**, 830-838 (2008).

磯貝 明, “TEMPO 酸化セルロースナノファイバー”, *高分子*, **58**, 90-91 (2009).

磯貝 明, “バイオ系ナノファイバーの調成と高機能部材への応用展開”, *繊維学会誌*, **65**, P7-P8 (2009).

〔学会発表〕(計73件)

Konno, N., et al., “Biodegradation of cellourenate by *Trichoderma reesei*”, 10th Int. Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Madison, USA, June (2007).

Isogai, A., “Preparation of cellulose single microfibrils by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose -Fundamentals and applications-”, Int. Nanofiber Symp., Tokyo, June (2007).

Saito, T., Isogai, A., “Cellulose nanofibers obtained by TEMPO-mediated oxidation of wood cellulose”, Int. Nanofiber Symp., Tokyo, June (2007).

Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y., Isogai, A., “Individualized cellulose nanofibers: Preparation from native cellulose by TEMPO-mediated oxidation”, Int. Cellulose Conf., Tokyo, October (2007).

Fan, Y., Saito, T., Isogai, A., “Application of TEMPO-mediated oxidation to chitin”, Int. Cellulose Conf., Tokyo, October (2007).

Ihashi, N., Habu, N., Konno, N., Isogai, A., “Purification and characterization of enzymes responsible for the degradation of polyuronates”, Int. Cellulose Conf., Tokyo, October (2007).

Konno, N., Igarashi, K., Habu, N., Samejima, M., Isogai, A., “Cellourenate lyase from *Trichoderma reesei*: Cloning and characterization”, Int. Cellulose Conf., Tokyo, October (2007).

Ishii, D., Tatsumi, D., Murata, K., Hayashi, H.,

Yoshitani, H., Isogai, A., Matsumoto, T., “Structural analysis and gelation mechanism of cellulose in LiCl-DMAC”, Int. Cellulose Conf., Tokyo, October (2007).

Isogai, T., Yanagisawa, M., Isogai, A., “SEC-MALLS analysis of cellourenic acid -The effect of leveling-off DP of celluloses on molecular mass of cellourenic acid-”, Int. Cellulose Conf., Tokyo, October (2007).

Okita, Y., Saito, T., Isogai, A., “Structural analysis of cellulosic microfibrils prepared by TEMPO-mediated oxidation”, Int. Cellulose Conf., Tokyo, October (2007).

Fukuzumi, H., Saito, T., Isogai, A., “Nanofiber films prepared by TEMPO-mediated oxidation of Native Cellulose”, Int. Cellulose Conf., Tokyo, October (2007).

Isogai, A., “Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose”, Int. Academy Wood Sci. Annual Meeting, Kyoto, October (2007).

Isogai, A., “Cellulose and Chitin Nanofibers Prepared by TMPO-mediated Oxidation”, European-Japanese Workshop Cellulose Functional Polysaccharides, Kyoto, October (2007).

Isogai, A., “Preparation of cellulose single nanofibers by TEMPO-mediated oxidation of native celluloses: Fundamentals and applications”, ACS National Meeting, New Orleans, April (2008).

Fan, Y., Saito, T., Isogai, A., “Chitin nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of alpha- and beta-chitin”, ACS National Meeting, New Orleans, April (2008).

Konno, N., Igarashi, K., Samejima, M., Isogai, A., “Characterization of cellourenate lyase from *Trichoderma reesei*”, ACS National Meeting, New Orleans, April (2008).

Mori, Y., Isogai, A., “Hybridization of cellulose nanofibers and vaterite form calcium carbonate”, ACS National Meeting, New Orleans, April (2008).

Isogai, A., Saito, T., Fukuzumi, H., Okita, Y., “Cellulose single nanofibers prepared from TEMPO-mediated oxidation of native cellulose -Fundamentals and applications”, TAPPI Int.

Conf. Pulping Paper Biotechnol., Nanjing, China (2008).

Fan, Y., Saito, T., Isogai, A., "Preparation of bi-nanofibers from natural materials", TAPPI Int. Conf. Pulping Paper Biotechnol., Nanjing, China (2008).

Saito, T., Hirota, M., Tamura, N., Fukuzumi, H., Isogai, A., "Individualization of nanosized plant cellulose fibrils achieved by TEMPO-mediated oxidation under neutral conditions", ACS National Meeting, Salt Lake City, USA (2009).

Isogai, A., "TEMPO-mediated oxidation of cellulose and other polysaccharides", ACS National Meeting, Salt Lake City, USA (2009).

Fukuzumi, H., Saito, T., Isogai, A., "Properties of TEMPO-oxidized cellulose nanofiber film", ACS National Meeting, Salt Lake City, USA (2009).

Isogai, T., Isogai, A., "Degree of polymerization (DP) of cellouronic acid prepared from ball-milled native celluloses by TEMPO-mediated oxidation", ACS National Meeting, Salt Lake City, USA (2009).

Iwamoto, S., Weihua, K., Iwata, T., Isogai, A., "Mechanical properties of cellulose single nanofiber measured by atomic force microscopy", ACS National Meeting, Salt Lake City, USA (2009).

Tamura, N., Hirota, M., Isogai, A., "Oxidation of polysaccharides by TEMPO/NaClO<sub>2</sub>/NaClO", ACS National Meeting, Salt Lake City, USA (2009).

他に国内学会発表合計 4 8 件

〔図書〕(計 3 件)

磯貝 明, "ウッドケミカルの新展開第 6 章 1 セルロース改質技術の現状", シーエムシー, p.131-141 (2007).

Yanagisawa, M., Isogai, A., "Integrated size-exclusion chromatography (SEC) analysis of cellulose and its derivatives" in "Characterization of lignocellulosic materials", Ed by Hu, T. Q., Blackwell, New York (2008).

斉藤継之, 磯貝 明, "セルロース利用の最先端: 第 編、第 3 章 セルロースナノファイバー新素材", シーエムシー, p.278-288

(2008).

〔産業財産権〕  
出願状況(計 2 2 件)

磯貝 明, 沖田祐介, 斉藤継之, "セルロースナノファイバーの製造方法", 特願 2007-160604 (2007).

磯貝 明, 和田昌久田村直之, "可溶性多糖の製造方法", 特願 2007-260608 (2007).

磯貝 明, 熊本吉晃, "酸素バリア用材料", 2007-205087 (2007).

磯貝 明, 熊本吉晃, "水蒸気バリア用材料", 2007-205088 (2007).

范 一民, 斉藤継之, 磯貝 明, "ベータキチンナノファイバーとその製造方法、ベータキチンナノファイバー分散液、ナノフィブリル構造体、及びキチン複合体", 特願 2007-277923 (2007).

斉藤継之, 磯貝 明, "セルロースナノファイバーとその製造方法、セルロースナノファイバー分散液", 特願 2007-304411 (2007).

宮脇正一, 阿部 裕, 飯嶋夕子, 磯貝 明, "セルロースナノファイバーの製造方法及びセルロースの酸化触媒", 特願 2007-340371 (2007).

宮脇正一, 阿部 裕, 飯嶋夕子, 磯貝 明, "セルロースの酸化方法、セルロースナノファイバーの製造方法", 特願 2007-340441 (2007).

磯貝 明, 斉藤継之, 平野昌一, 由井美也, 田中千晶, "セルロース繊維の親水性化処理方法、親水性セルロース繊維、処理剤、及び繊維製品", 特願 2008-042406 (2008).

磯貝 明, 齋藤継之, 田村直之, 廣田真之, "セルロースの改質方法、改質セルロース、セロウロン酸、セルロース微結晶", 特願 2008-051351 (2008).

磯貝 明, 齋藤継之, 田村直之, 廣田真之, "機能性セルロースビーズの製造方法、及び機能性セルロースビーズ", 特願 2008-051352 (2008).

磯貝 明, 磯貝拓也, "セロウロン酸およびその製造方法", 特願 2008-157042 (2008).

宮脇正一, 勝川志穂, 阿部 裕, 飯嶋夕子, 磯貝 明, "製紙用添加剤及びそれを含有する

紙”, 特願 2008-091333 (2008).

宮脇正一, 勝川志穂, 阿部 裕, 飯嶋夕子, 磯貝 明, “セルロースナノファイバーの製造方法”, 特願 2008-094050 (2008).

宮脇正一, 勝川志穂, 阿部 裕, 飯嶋夕子, 磯貝 明, “加工用紙用原紙”, 特願 2008-093496 (2008).

磯貝 明, 角 英行, 後居洋介, “化粧品組成物”, 特願 2008-197848 (2008).

磯貝 明, 角 英行, 後居洋介, “スプレー用組成物およびそれを用いたスプレー噴霧装置”, 特願 2008-197849 (2008).

磯貝 明, 角 英行, 後居洋介, “ゲル状組成物”, 特願 2008-197847 (2008).

磯貝 明, 齋藤継之, 加藤隆史, 西村達也, 緒明 佑哉, “セルロース及びキチンナノファイバーとアモルファス炭酸塩及びリン酸塩の複合材料、その製造方法”, 特願 2008-206488 (2008).

磯貝 明, 齋藤継之, 范 一民, “キチンナノファイバーとその製造方法、キチンナノファイバー分散液、ナノフィブリル構造体、及びキチン複合体”, 特願 2009-024286 (2009).

熊本吉晃, 向井健太, 宇賀神徹, 前澤貴浩, 本棒直樹, 磯貝 明, “ガスバリア用材料”, WO 2009/020239 A1 (2009).

向井健太, 熊本吉晃, 磯貝 明, “セルロース繊維の懸濁液とその製造方法”, 特願 2009-025916 (2009).

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

化学工業日報にセルロースナノファイバーの記事掲載 (2009-2-13).

日刊工業新聞にキチンナノファイバーの記事掲載 (2009-3-20).

日刊工業新聞にセルロースナノファイバーの記事掲載 (2009-3-30).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

磯貝 明 (東京大学 大学院農学生命科学研究科 教授)

### (2) 研究分担者

初年度のみ

杉山淳司 (京都大学 生存圏研究所 教授)

### (3) 連携研究者

初年度は、

和田昌久 (東京大学 大学院農学生命科学研究科 准教授)

羽生直人 (宇都宮大学 農学部 准教授)

北岡卓也 (九州大学 大学院農学研究院 准教授)

次年度以降は、

杉山淳司 (京都大学 生存圏研究所 教授)

和田昌久 (東京大学 大学院農学生命科学研究科 准教授)

羽生直人 (宇都宮大学 農学部 准教授)

北岡卓也 (九州大学 大学院農学研究院 准教授)