

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21228007

研究課題名(和文) バイオマス系完全分散ナノフィブリルの創製と環境対応型材料への変換

研究課題名(英文) Preparation of Completely Individualized Nanofibrils from Biomass, and Their Conversions to Environmentally Compatible Materials

研究代表者

磯貝 明 (Isogai, Akira)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40191879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 153,100,000円、(間接経費) 45,930,000円

研究成果の概要(和文)：結晶性マイクロフィブリルを有する構造多糖のセルロースおよびキチン、貯蔵多糖のカードランについて従来型および新規TEMPO触媒酸化を適用し、反応条件と酸化多糖の化学構造、ナノ構造、分子量変化を明らかにするとともに、新たな酸化機構を見出した。得られたバイオ系ナノフィブリル表面を位置選択的に高効率で改質する方法を検討し、生分解性のスイッチ機能付与、親水性から疎水性へのスイッチ機能付与方法を構築した。得られたバイオ系ナノフィブリルから各種複合材料を調製して構造および特性を検討し、軽量高強度化、ガスバリア性・選択分離性、重金属捕捉機能、透明導電性など、新規バイオ系ナノ材料として優れた特性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The conventional/new TEMPO-mediated oxidations were applied to cellulose and chitin consisting of crystalline microfibrils and curdlan. Chemical structures, nanostructures and molecular weights of the obtained oxidized polysaccharides were elucidated. During these studies, new TEMPO-mediated oxidation mechanisms were made clear. Position-selective and efficient surface modification methods of TEMPO-oxidized nanofibrils via ion-exchange treatment were studied, and switching technologies of the nanofibrils from biodegradable to stable and from hydrophilic to hydrophobic nature were established. New composite materials consisting of the surface-modified nanofibrils were prepared under various conditions, and some of them had quite high mechanical strengths, gas-barrier/gas-selective separation functions, heavy-metal adsorption behavior, and transparent/flexible/conductive properties. Thus, TEMPO-oxidized nanofibrils have versatile potential applications as new bio-based nanomaterials.

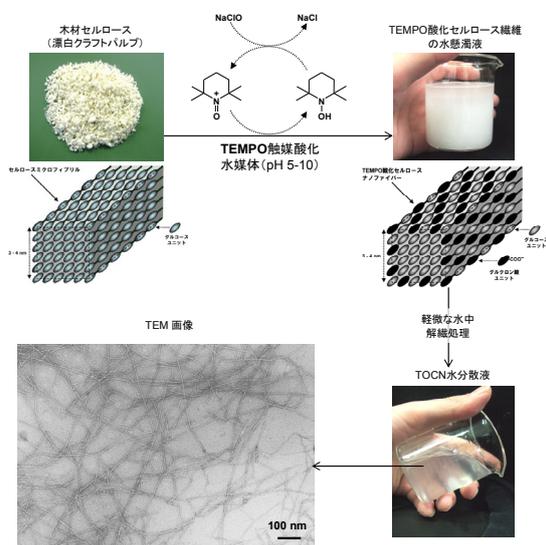
研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：セルロース ナノフィブリル TEMPO 触媒酸化 バイオマス キチン ナノ材料 ミクロフィブリル

1. 研究開始当初の背景

循環型社会の構築のためには、再生産可能なバイオマスの量的質的な利用拡大が求められている。これまでの研究成果から、TEMPO (2,2,6,6-テトラメチルピペリジニル-1-オキシラジカル) 触媒酸化 (下反応図) によって得られるセルロース酸化物が、先端ナノ材料に展開できる十分なポテンシャルを有していることを見出した。



2. 研究の目的

本研究では、TEMPO 触媒酸化による荷電反発型のナノ分散原理を基盤とし、セルロース、キチンなど豊富な結晶性バイオマスに適用してダウンサイジングによる完全分散ナノファイブリル化条件の構築と、得られたバイオ系新規ナノ素材のナノ構造、生分解性解析、およびナノ複合化による新規環境適合型材料開発を進める。得られた成果に基づき、エレクトロニクスや医療材料、環境浄化・エネルギー材料など、新規バイオ系ナノ先端材料に利用するための幅広い基礎的知見の蓄積と科学的解析を進め、バイオマス系ナノテクノロジー関連学術分野の構築を目指す。また、成果の一部は産学連携によって社会に還元していくことを目的とする。さらに、本開発手法をバイオマス関連の固体構造あるいは生合成メカニズムなど、未解決の基礎科学分野への解析手法としての適用も検討する。

3. 研究の方法

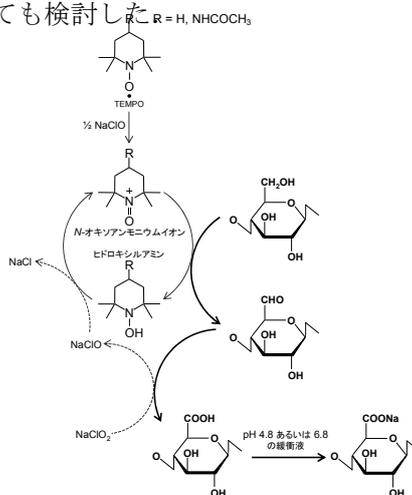
各種セルロース、キチン等の結晶性天然高分子について、条件を変えて TEMPO 触媒酸化処理を行い、酸化生成物の化学構造、固体構造、ナノ分散性、表面特性等を解析し、反応条件との関係を明らかにする。さらに、水中解繊処理によって得られるファイブリルのナノ分散性、ナノ構造、官能基分布を解析し、バイオ系ナノ素材としての特性評価および課題抽出を行う。TEMPO 酸化物を水中あるいは有機溶剤中でナノ分散させ、ヒドロゲル、エアロゲル、自立フィルム、および他の有機・無機物との複合化物を調製し、光学、力

学、電気および熱特性を評価することで、バイオ系ナノ材料としての特性を抽出する。また、各種ナノファイブリル素材を分解する酵素の単離、構造解析を行い、生分解機構、生分解スイッチ機能付与を検討する。これらの研究は共同研究者間の連携により横断的に進める。

4. 研究成果

(1) 新たな TEMPO 触媒酸化反応の検討

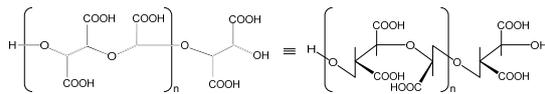
①従来の TEMPO/NaBr/NaClO を用いた水系 pH 10 の酸化反応 (NaClO が消費される共酸化剤で、TEMPO と NaBr が触媒量) に加えて、pH 5~7 の中性系での TEMPO/NaClO/NaClO₂ 酸化反応を見出した (TEMPO と NaClO が触媒量で、NaClO₂ が消費される共酸化剤; 下図)。さらに、塩素系酸化剤を用いない、TEMPO 電解酸化についても検討した (R = H, NHCOCH₃)



②弱アルカリ性での TEMPO 触媒酸化は短時間 (1.5 時間以内) で効率的に進むが、多糖の顕著な分子量低下が避けられない。一方、中性系の TEMPO 触媒酸化では、中間体の C6-アルデヒド基は全て C6-カルボキシル基に酸化され、β 脱離による低分子化を制御できる。従って、高分子量で熱安定性の高い TEMPO 酸化セルロース・多糖が得られる。一方、TEMPO 電解酸化では、塩素系の酸化剤を持ちないために逆に C6-アルデヒド基含有量が約 30%、C6-カルボキシル基量が 60%ほどの、アルデヒド基量の多い TEMPO 酸化多糖が得られる。

③触媒として TEMPO のほかに 20 種類ほどの TEMPO 誘導体類を検討した。その結果、TEMPO と同様の高い触媒機能を有する物質を見出した。また、アダマンタン構造を有する安定ニトロキシラジカルを用いることにより、同一カルボキシル基量の酸化セルロースを調製する場合には、触媒添加量を 1/32 以下に削減できた。このように多様な TEMPO 触媒酸化反応とその最適条件を見出すと共に、各反応の特徴を把握することで、研究目的に適応した反応・反応条件の選択範囲を広げることができた。さらに、アダマンタン型 TEMPO を用いる検討の過程で副次的に、セルロースの C2, C3, C6 位が全てカルボキシル基に酸化されたトリカルボキシルセルロース (メタ酒

石酸/水和グリオキシル酸交互共重合体)が高収率で得られる新規段階での調製方法も見出した(下図)。

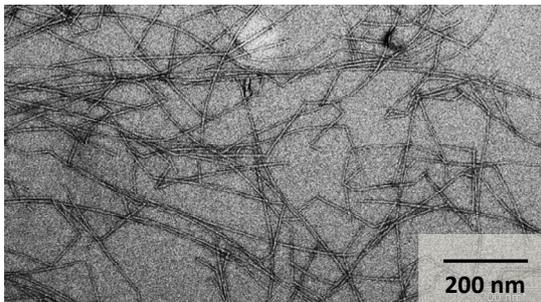


(2) 様々な多糖への TEMPO 酸化反応の適用:

上記で得られた多様な TEMPO 触媒酸化反応および反応条件を, リグニン含有の植物試料, 非セルロース, ヘミセルロース類を高い比率で含有している植物ホロセルロース類, 再生セルロース繊維, 再生セルロースビーズ, α および β キチン, β -1,3-グルカンであるカードランやパラミロン, デンプン, アミロース等に適用し, 得られた酸化多糖の構造・分子量等と安定性, 機能, 生分解性等の関係を検討した. その結果, C6 位の 1 級水酸基が 100% 酸化されて均一な化学構造を有する, 多くの新規水溶性ポリウロン酸類を調製することができた. また, TEMPO 触媒酸化反応効率に対する, リグニンやヘミセルロースの存在の影響を検討し, 消費される共酸化剤は, これら非セルロース成分の分解-水可溶化-除去に消費されることが判明した. さらに, 高分子量のポリウロン酸類の調製方法, 再生セルロースビーズの表面構造を維持し, カルボキシル基を有してイオン交換能のある機能性ビーズの調製方法を明らかにすることができた.

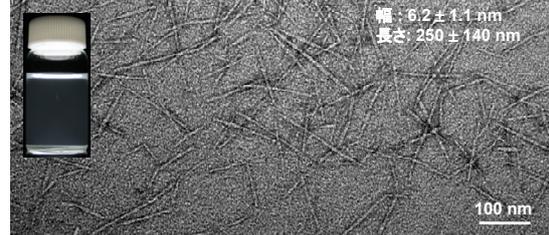
(3) 新しい完全ナノ分散化多糖ナノフィブリルの調製方法の検討:

① 上述の(2)で述べた, 新たな TEMPO 触媒酸化反応および反応条件の検討に対応し, 得られた TEMPO 酸化セルロース (TOC) のカルボキシル基量と, 水中解繊処理によって得られる TEMPO 酸化セルロースのナノ分散性, TEMPO 酸化ナノフィブリル (TOCN) / 水分散液の光学透明性, せん断粘度等の解析を進めた. 中性系の TEMPO 触媒酸化では, 高重合度で高カルボキシル基量を与える反応条件を見出し, 得られた TOC を水中解繊処理することで幅は同じく 3nm だが, 極めて高アスペクト比の完全ナノ分散化した木材 TOCN を得ることができた. (下図)



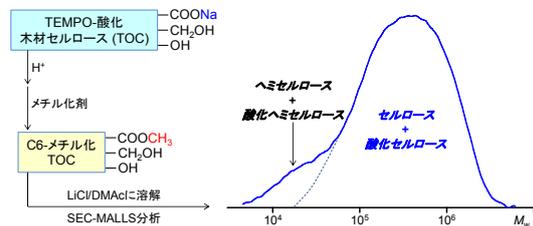
② また, TOCN とは逆に, 結晶性のキチンナノフィブリルの表面の 1 級アミン基を, 酢酸添加することでプロトン化することができる. その結果, 高密度でプラスの表面荷電をキチ

ンナノフィブリルに付与することができ, フィブリル間に荷電反発力が生じる. 結果的に弱酸性水溶液中で軽微な解繊処理を行うことにより, 幅約 6nm で長さ約 250nm の高結晶性キチンナノフィブリルを得ることができた. 下図に, カニ由来の α キチンから調製した透明ナノ分散液と, ナノフィブリルの電



(4) TEMPO 酸化セルロースの構造解析:

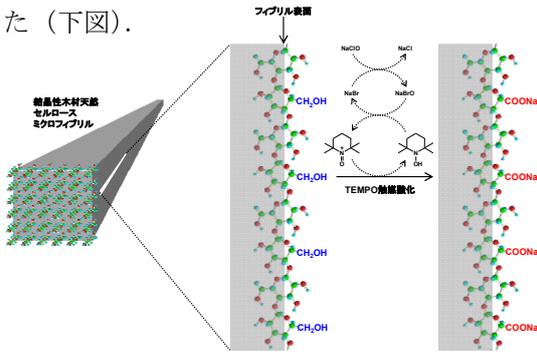
① TOC の正確な分子量・分子量分布の測定方法の確立は, TOCN の長さ・長さ分布評価法の確立同様, TOCN を先端材料として利用する上で不可欠である. TOC, TOCN とともに銅エチレンジアミン溶液 (cuen) に溶解するため, これまでは cuen 溶液を用いて粘度法によって重合度を評価してきた. しかし cuen はアルカリ性であり, TOC, TOCN の溶解, 測定過程での分子量低下が危惧される. そこで, TOC, TOCN のカルボキシル基を選択的にメチルエステル化し, LiCl/DMAc 溶液に溶解させ, 多角度光散乱検出器付き溶質排除クロマトグラフィー (SEC-MALLS) による測定方法を構築した(下図).



② また, TEMPO 触媒酸化反応の天然セルロースに対する反応の特異性を, 木材セルロース, 綿セルロース, バクテリアセルロース, ホヤセルロース, 海藻由来のセルロースについて, セルロースの結晶幅と導入された最大カルボキシル基量の関係から検討した. その結果, 結晶幅 \rightarrow 結晶の比表面積から計算される計算上の最大カルボキシル基量と, TEMPO 触媒酸化反応によって導入された実測の最大カルボキシル基量はよく対応していた.

③ さらに, TEMPO 酸化セルロース表面の酸化セルロース分子をアルカリ水溶液で剥離抽出し, その化学構造を検討した. その結果, 人工的には合成できない「グルコースとグルクロン酸の交互共重合体」であった. 以上の結果から, 結晶性天然セルロースの TEMPO 触媒酸化反応が, 結晶表面に露出しているグルコースユニットの C6 位の 1 級水酸基のみを位置選択的, 規則的にカルボキシル基に変換し, 表面に高密度で負電荷を付与し, 結晶内部のセルロースには酸化が起こらない, 極めて特異的な反応であることが明らかになっ

た（下図）.



(5) TOCN の構造と特性解析：

①木材セルロース由来のTOCNの幅は常に3nmで一定であるが、長さ／長さ分布は酸化条件、水中解繊条件により異なる。これらを正確に評価し、制御可能にすることはTOCNを先端材料として利用する上で不可欠である。これまで、TOCNの酸・アルカリ条件での安定性・化学構造変化、TOCNの分子鎖長と長さの関係、TOCN／水希薄分散液のせん断粘度とTOCNの長さの関係、TOCN／水分散液の耐塩性（NaClあるいは二価のCa、Mgイオン濃度に対する、ナノ分散安定性）の関係、TOCNの耐熱性等を明らかにした。TOCNをプラスチックと混合してナノ複合材料を調製する際には、耐熱性の向上が必要となる。TOCNの対イオン交換やエステル化により熱分解点を増加することができた。

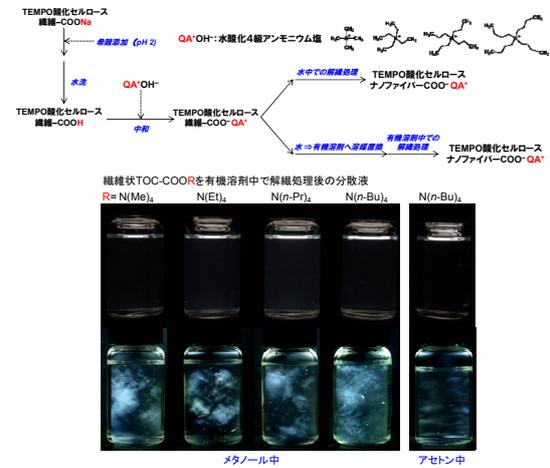
②TOCNの特徴は、1本1本のマイクロフィブリルを完全分離分散している点である。そこで、1本のセルロースマイクロフィブリルの引張弾性率をAFMのカンチレバーによる応力-歪曲線から、引張破断強度とキャビテーションによる臨界TOCN長さから、計算によって求めた。その結果、弾性率が約140GPa、引張弾性率が約3GPaと、極めて高強度であることが判明した。特に、TOCNは比重が鋼鉄の1/5にも関わらず、破断強度は鋼鉄の約5倍を示し、多層カーボンナノチューブ、ケブラー等の高強度繊維に匹敵した。

(6) TOC および TOCN の表面改質：

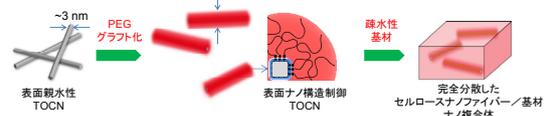
①TOC、TOCNは結晶性マイクロフィブリル表面に高密度で規則的に、イオン交換可能なカルボキシル基のNa塩が存在する。そこで、対イオン交換によるTOC、TOCNの改質-機能化について検討した。特に、親水性⇒疎水性、生分解性⇒難生分解性、熱分解性⇒耐熱性付与等のスイッチ機能を簡便なイオン交換処理で付与する方法を構築することを目的とした。

②希酸処理によってTOCN-COOH型に変換することにより、DMF等の非プロトン性極性有機溶剤中でのナノ分散化が可能になった。また、TOC（繊維状TEMPO酸化パルプ）の段階で、希酸処理でTOC-COOH型に変換後、アンモニア水、各種水酸化4級テトラアルキルアンモニウム（アルキル基：メチル、エチル、n-ブチル、n-オクチル）を当量添加することで、中和反応によって、TOC-COO⁻N⁺R₄型のカルボ

キシル基のアンモニウム塩構造に効率的（交換率>95%）に変換できた。これらの表面改質TOCは水中あるいは多くの有機溶剤中での解繊処理で完全ナノ分散が可能であった。下図にそのプロセスと、分散液の画像を示す。透明で、静置状態の偏光下の観察で複屈折を示すことが、ナノ分散化の基準となる。



③上記の4級アルキルアンモニウム塩化以外にも、C10～C16の直鎖アルキルアンモニウム塩化、ポリエチレングリコール（PEG）鎖のアンモニウム塩構造によるグラフト化等を検討した。このように表面改質したTOCNはイソプロピルアルコール、トルエン、クロロホルム等の有機溶剤中でナノ分散可能になり、簡便な操作でTOCNを親水性⇒疎水性に変換することができた（下図）。



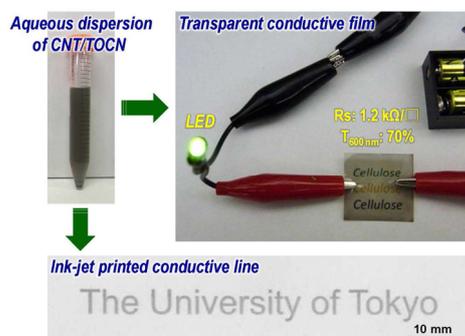
④さらに、TOCNフィルムの対イオン交換処理によるセルラーゼに対する分解性の制御、土中埋め込み試験での生分解性のスイッチ機能についても検討した。対イオンがH型、Cu塩型、Ca塩型で耐性が高く、NH₄塩型、Na型で生分解性が高い。このような対イオンの選択により生分解性を制御できる。

(7) TOCN による新規ナノ複合材料の調製と構造および物性評価：

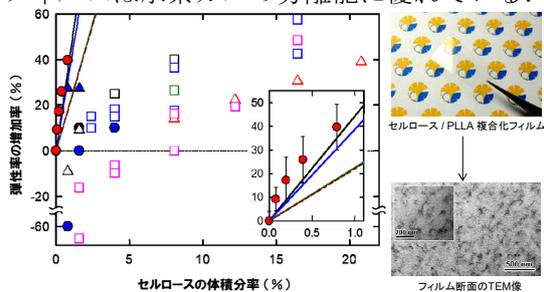
TOCNを基材あるいはナノ添加材成分として様々な無機あるいは有機材料と複合化することにより期待される発現機能として、軽量高強度化、ガスバリア性、ガス選択分離性、透明導電性、耐熱性、エアフィルター機能、光学フィルム機能、高効率触媒機能、食品としての機能、人工骨などの医療材料特性、高剛性ヒドロゲル、低熱伝導率エアロゲル等の先端的特性がある。以下に複合化に関して検討した事例を示す。

①TOCNと同じくナノ素材である表面カルボキシル化単層カーボンナノチューブ（SWCNT）の水分散液を混合させ、キャスト乾燥させることで複合化フィルムを調製した。複合化フィルムは完全に透明ではなかったが、パー

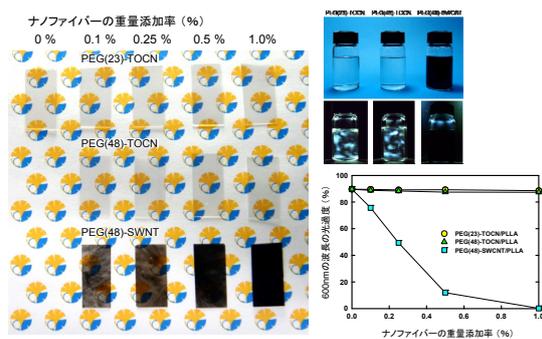
コレーション理論に基づいて、添加量の閾値以上で導電性を示した。また、TOCNの親水性により、湿度環境に対応して導電性が変化する環境応答性機能を発現した。さらに、TOCN-SWCNT/水分散液をインクジェット印刷することにより、導電性ラインを紙基材上にプリントすることができた(下図)。



②カルボキシル基の対イオンがNa型のTOCNフィルムは高い酸素バリア性を有している。そこで、対イオンを他の金属イオン(Li, K, Cs)あるいはH型に交換したTOCNフィルムを作製し、気体の選択透過性を検討した。TOCN-COONa型フィルム、TOCN-COOH型フィルムともに、1ミクロンの厚さにおける気体の単位面積当たり、単位時間の透過度は水素>二酸化炭素>酸素>窒素の順となった。この順は気体の動的半径と対応しており、気体の透過度がTOCNフィルム中の空孔サイズに対応していることが示された。TOCN-COOH型フィルムは特に高い水素選択透過性を示し、本フィルムは水素ガスの分離能に優れている。



③表面疎水化 TOCN-COO/PEG と生分解性プラスチックであるポリ乳酸(PLLA)を複合化させたところ、TOCNエレメントはPLLA基材中で凝集せずにナノ分散状態を維持し、その結果、極めて少量のTOCN添加で効率的に弾性率の向上効果が認められた(上図赤丸印)。



④上記の結果を踏まえ、SWCNT-COOHを用い、ともにPEG鎖を導入し、PLLAとの複合化を検討した。

TOCN-COO/PEGをPLLAと複合化した場合には、透明フレキシブルなフィルムが得られ(上図)、僅か1%添加量まで、添加量に対応した明瞭な弾性率および破断強度の向上が認められた。一方、SWCNT-COO/PEG添加の場合には透明性が低下して黒色となり、弾性率は添加量に対応した向上が見られなかった。破断面のSEM観察から、TOCN-COO/PEGはPLLA基材中でナノ分散状態を維持していたが、SWCNT-COO/PEGは凝集していた。これは、同じカルボキシル基量でも、TOCNはその分布状態が均一であるのに対し、SWCNT-COOHはカルボキシル基が不均一に存在しているためである。

⑤その他、モンモリロナイト等の無機ナノ素材、ヒドロキシアパタイト、非晶性炭酸カルシウム、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ガラスウール、キチンナノファイバー、各種金属ナノ粒子との複合化を検討し、興味深い結果を得た。

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120件)

- ① Fujisawa, S.; Saito, T.; Kimra, S.; Iwata, T.; Isogai, A., "Surface engineering of ultrafine cellulose nanofibrils towards polymer nanocomposite materials", *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 14, 2013, pp. 1541-1546.
DOI: 10.1021/bm400178m
- ② Koga, H.; Saito, T.; Kitaoka, T.; Nogi, M.; Suganuma, K.; Isogai, A., "Transparent, conductive and printable composites consisting of nanocellulose and carbon nanotube", *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 14, 2013, pp. 1160-1165.
DOI: 10.1021/bm400075f
- ③ Saito, T.; Kuramae, R.; Wohlert, J.; Berglund, L. A.; Isogai, A., "An ultrastrong nanofibrillar biomaterial: Strength of single cellulose nanofibrils revealed from sonication-induced fragmentation", *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 14, 2013, pp. 248-253.
DOI: 10.1021/bm301674e
- ④ Wu, C.-N.; Saito, T.; Fujisawa, S.; Fukuzumi, H.; Isogai, A., "Ultrastrong and high gas-barrier nanocellulose/clay layered composites", *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 13, 2012, pp. 1927-1932.
DOI: 10.1021/bm300465d
- ⑤ Saito, T.; Uematsu, T.; Kimura, S.; Enomae, T.; Isogai, A., "Self-aligned integration of native cellulose nanofibrils towards producing diverse bulk materials", *Soft Matter*, 査読有, Vol. 7, 2011, pp. 8804-8809.
DOI: 10.1039/c1sm06050c

- ⑥ Isogai, A.; Saito, T.; Fukuzumi, H., "TEMPO-oxidized cellulose nanofibers", *Nanoscale*, 査読有, Vol. 3, 2011, pp. 71–85. DOI: 10.1039/c0nr00583e
- ⑦ Hirota, M.; Furihata, K.; Saito, T.; Kawada, T.; Isogai, A., "Glucose/glucuronic acid alternating copolysaccharide prepared from TEMPO-oxidized native celluloses by surface-peeling", *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, Vol. 49, 2010, pp. 7670–7672. DOI: 10.1002/anie.201003848
- ⑧ Okita, Y.; Saito, T.; Isogai, A., "Entire surface oxidation of various cellulose microfibrils by TEMPO-mediated oxidation", *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 11, 2010, pp. 1696–1700. DOI: 10.1021/bm100214b
- ⑨ Iwamoto, S.; Kai, W.; Iwata, T.; Isogai, A., "Elastic modulus of single cellulose microfibrils from tunicate measured by atomic force microscopy", *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 10, 2009, pp. 2571–2576. DOI: 10.1021/bm900520n
- ⑩ Saito, T.; Hirota, M.; Tamura, N.; Kimura, S.; Heux, L.; Isogai, A., "Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst under neutral conditions", *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 10, 2009, pp. 1992–1996. DOI: 10.1021/bm900414t

[学会発表] (計 260件)

- ① Isogai, A., "Applications of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils as gas-barrier films and bio-based composite materials", *EPNOE 2013, Nice, France*, October 21–25, 2013.
- ② Isogai, A., "Characteristic properties of composite materials containing TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils", *International Cellulose Conference 2013, Sapporo, Japan*, October 10–12, 2012.
- ③ Isogai, A., "Nanofiber films from wood celluloses: Packaging barrier opportunities", *Tappi International Conference on Nanotechnology for Renewable Materials, Arlington, USA*, June 6–8, 2011.
- ④ Isogai, A., "Benefits and challenges of TEMPO-oxidized cellulose nanofibers", *Recent Advances in Fibrillar nanocellulose research, Trondheim, Norway*, November 16–17, 2010.
- ⑤ Isogai, A., "Chemistry-assisted individualization of wood cellulose microfibrils", *Nanomaterial Workshop, Stockholm, Sweden*, December 2–3, 2009.

[図書] (計 9件)

- ① Isogai, A., World Scientific, Pretreatment of cellulose for further processing, in "Handbook of Green Materials; Processing Technologies, Properties and Applications", Ed. Oksman, K., 2013, pp. 1–20.
- ② Isogai, A., Berglund, L. A. FRS, Microfibrillar and nanofibrillar cellulose in "Advances in Pulp and Paper Research Cambridge 2013, Vol. 2", Ed. I'Anson, S. J., 2013, pp. 737–763.

[産業財産権]

○出願状況 (計 30件)

名称: 未公開

発明者: 磯貝 明, 齋藤 継之, ウ・シュナン

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-145419

出願年月日: 2011年6月30日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://psl.fp.a.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯貝 明 (ISOGAI, Akira)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 40191879

(2) 研究分担者

木村 聡 (KIMURA, Satoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 00420224

岩田 忠久 (IWATA, Tadahisa)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 30281661

和田 昌久 (WADA, Masahisa)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 40270897

五十嵐 圭日子 (IGARASHI, Kiyohiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 80345181

齋藤 継之 (SAITO, Tsuguyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 90533993