リグノセルロースからのナノ解繊物と その酵素糖化性および複合材料化

李 承桓^{1,2*}・岩本伸一郎¹・遠藤 貴士¹

Nano-scopic Fibrillated Product from Lignocellulose and Its Enzymatic Saccharification and Nanocomposite Application

Seung-Hwan LEE^{1,2*}, Shinichiro IWAMOTO¹, Takashi ENDO¹(¹Biomass Refinery Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST), Hiroshima, Japan. ²Department of Forest Biomaterials Engineering, College of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea)

This paper summarizes our research activities to produce nanoscopic fibrillated product from lignocellulosic biomass using mechano-chemical treatment. Hydrothermal and ozone pretreatment were effective to loosen the cell wall structure, resulting in the improvement of mechanical fibrillation. Characterization of thus-obtained products was conducted, showing sub-micron and/or nanoscopic fibrous morphology, high surface area and high enzymatic digestibility. The effect of chemical composition of the fibrillated product on the adsorption and degradation behavior of various cellulase was investigated by Quartz Crystal Microbalance(QCM). The relationship between the aspect ratio and intrinsic viscosity for the fibrillated product with high aspect ratio was also investigated. The fibrillated product was applied as the reinforcement for nanocomposites and various surfactants were attempted to improve the distribution of the fibrillated product in polymer matrix.

Key Words : Lignocellulose, Nanocomposite, Enzymatic saccharification, Hydrothermal treatment

1. は じ め に

近年、地球環境変化を伴う気候変動にどう対応すべきかという課題は多くの研究者を悩ませている。気候変動の原因には自然の要素と人為的な原因があるが、特に人為的な原因として化石資源の大量消費が引き起こす地球温暖化があげられる。その解決策の一つとして、自然が作り出す再生産可能なバイオマス資源を有効に活用する研究が活発に行われており、現在の使い捨て文明とは異なる循環型の新しい文明の構築への寄与が期待されている。このような背景を基に、著者らは木材を含むリグノセルロース系バイオマス資源を種々の化学および機械的な処理を施すことにより、効率よくミクロンまたはナノスケールまで解繊し、バイオエネルギーや複合材料化へ展開する研究を行っている。本稿では以前発表した三つの総説をベースに最近の研究内容を加えて紹介する¹⁻³⁾。

2. 機械的解繊処理とナノコンポジット

セルロースナノ繊維は、長い繊維長を持ち軸比が大きいセルロースマイクロフィブリルと硫酸加水分解等で得られる軸比が小さい高結晶性セルロースナノクリスタルと大きく

二つに分けることができる。セルロースナノ繊維の弾性率は130 – 150 GPaと言われており、リグノセルロースからどう効率よく取り出し、高分子材料に分散させ複合材料化するかにについて活発な研究活動がなされている。これまで精製したパルプ、即ちヘミセルロースやリグニン成分を除去したセルロース原料を用いたナノ繊維の調製方法や複合材料への応用研究については多く研究が行われている。しかし、木材そのものすべてを機械的にナノスケールまで解繊し、高分子と複合する研究例は乏しい。特に解繊物にヘミセルロースおよびリグニンを含むことで高分子への分散性や界面においての接着性を含む分子間相互作用などに及ぼす影響を考慮しないといけない。特に、ナノフィラー強化ナノコンポジットにおいては、ナノフィラーの分散性をどう向上させるかが最重要命題となっている。

セルロースナノ繊維を得るためには水系で機械的に解繊処理する必要がある。そのため得られた解繊物は、大量の水を含んでいる。この解繊物をオレフィン樹脂等に分散させるためには、当然、水を除去する必要がある。しかしながら、一般的な乾燥方法ではセルロースナノ繊維は強度に凝集してしまう。そこで我々は、ナノ繊維同士の凝集抑制を目的として、種々のアニオン性界面活性剤の添加効果に

ついて調べた。ヒノキ木粉 (0.2 mm) を直接に湿式ディスクミル処理してセルロースナノ繊維が分散したスラリーを得た。次に、スラリーにアニオン性界面活性剤を添加・混合した後に凍結乾燥した。得られた乾燥ナノ解繊物をポリプロピレン (PP) へ複合化し、分散性や複合体の強度特性に及ぼす影響を明らかにした。アニオン性界面活性剤としてはsodium stearate (SS), sodium oleate (SO), sodium dodecyl sulfate (SDS), carboxymethylcellulose (CMC) を用いて、ナノ解繊物の水分散スラリーに0.2 – 0.5 %添加して凍結乾燥し点ポリプロピレンと溶融混練により複合化した。相溶化剤としてはマレイン酸変性ポリプロピレン (MAPP) を用いた。SSが最も複合材料の引っ張り強度や弾性率を向上させており、その量は0.2 %が最適であった (Figure 1)。電子顕微鏡による破断面観察および比表面積測定から、アニオン性界面活性剤の存在によりナノ解繊物同士の乾燥時の凝集が抑制されるとともにPPへの分散性が向上したことが確認されている⁴⁾。

また、木材パルプを高圧ホモジナイザーを用いて解繊したマイクロフィブリル化セルロース (MFC) に界面活性剤としてpolyethylene nonylphenyl ether (PENPE) を添加してMFCを表面処理し、PPへの分散性や複合材料の物性への影響を調べている⁵⁾。過剰のPENPEをMFCスラリーに添加し凍結乾燥後、トルエンを用いて未吸着のPENPEを洗浄・除去して表面修飾MFCを調製した。表面修飾MFCとPPとを100 °Cのトルエン中に分散させ、トルエンを蒸発除去して表面修飾MFC-PP均一混合物を得た。次に170 °Cで溶融混練することにより複合化を行った。得られた複合体を熱圧成型して得られたシートの外観は均一でMFCの塊などの凝集物は目視では確認できなかった。界面活性剤無添加の複合体に比べて、弾性率や降伏強度は大きい変化は見せなかったが、伸び率は5 %MFCの含有で

600 %以上と約3倍以上の高い値を示した。

さらにナノ解繊物のPPへの分散性を向上させる方法として、低融点のプロピレン-エチレン共重合体およびプロピレン-ブテン共重合体に予め解繊物 (20-50 wt%) を分散させてマスタバッチコンパウンド (MBC) を調製し、それをさらにPPへと複合化する方法も検討している。PPの融点は約180 °Cと高く、この温度で水を大量に含むナノ解繊物の凝集を抑制しながら直接溶融混練することは難しい。そこで、溶融温度が100 °C以下のポリマーに解繊物を徐々に混合しながら水を蒸発させて複合し、20 %のナノ解繊物が含まれるMBCを調製した。得られたMBCをさらにPPと溶融混練して複合体を調製した。この方法で得られた複合体の概観は非常に均一でナノ解繊物の塊はほとんど無く、強度特性も大きく向上した。1 %のナノ繊維含有で弾性率は700 MPaから800 MPa、降伏点強度は20 MPaから24 MPaまで向上した。また、MBCに含まれる解繊物の量を50 %まで増加させることによって、最終的なPPとの複合体での解繊物含有量を10 %まで増やすことができており、弾性率は1050 MPa、降伏点強度は27 MPaまでさらに向上させることができた。

また、類似の方法で低融点高分子としてポリカプロラクトン (PCL) を用いた研究についても行った。10 %のナノ繊維を含有したMBCを調製し、わずか1 %の繊維で強化したPP複合材料を調製することができた。PPとPCLの乏しい相溶性にもかかわらず、1 %のナノ繊維強化で弾性率が681 MPa 1161 MPaまで向上することが分かった⁶⁾。今後、ナノ解繊物高含有MBCの調製方法やマトリクス樹脂と高い相溶性を持つ低融点樹脂の探索などについて検討を進める必要がある。

湿式機械的粉碎処理の組み合わせによる特殊な解繊物の調製法について研究を行っている。精製パルプ (W100,

Figure 1 Effect of anionic surfactants on tensile modulus and upper yield strength of PP nanocomposite. PP/MFLC, 70/30; MAPP content, 5 wt% based on filler; Surfactant content, 0.2 wt% on the basis of total weight of the composite.

Figure 2 AFM topographic images of cellulose nanospheres at different ball-milling time (a-c) after 10 pass homogenization.

KC flock, 日本製紙ケミカル) をボールミル処理した後、水存在下で高圧ホモジナイザー処理を行い、得られる解繊物の形態および結晶性の変化を調べた。その結果、高圧ホモジナイザー処理回数によって得られる解繊物は長さが100–600 nm、直径が6–24 nm範囲の繊維状のものが得られており、さらにボールミル処理を組み合わせることで球状のナノパティクルへと形態変化することが分かった (Figure 2)。このナノパティクルでは、結晶形は天然型のセルロースI型から再生型のセルロースII型へと変化した。セルロースIIの生成は、ボールミル処理時間が長くなるのに従ってより顕著であった。このことから、セルロースを溶解することなく湿式機械的処理のみでセルロースII型の球状ナノパティクルが得られることを明らかにした⁷⁾。

また、ナノ解繊物の粘度特性測定による形状評価についても研究を進めている。セルロースナノクリスタル(CNC)は棒状粒子とみなせるほどアスペクト比が小さく、形態観察や粘度特性から長さ(アスペクト比)については十分に議論されている。しかし、機械的処理のみにより得られる、アスペクト比の大きなナノファイバーについては、顕微鏡的にも一本の繊維のみを観察することは困難で、長さについて十分に議論されていない。そこで、我々は脱リグニンしたヒノキホロセルロースを高圧ホモジナイザー処理して調製したナノ繊維の形状について、原子間力顕微鏡観察(AFM)による直接的観察結果と水懸濁液の粘度特性の関係について検討している⁸⁾。AFM観察の結果、ナ

ノファイバーの幅は 3.2 ± 0.7 nm、長さは 940 ± 320 nm、軸比は 300 ± 89 であった。濃度0.1 %以下のナノファイバー希薄水懸濁液の粘度は、高せん断速度域においてはニュートン流体的挙動を示し、十分な希薄濃度条件ではナノファイバー間相互作用が無いことが示唆された。得られた粘度から固有粘度を求め、Shimhaによって提案された棒状粒子の粘度式を適用した結果、ナノファイバーの軸比は156であった。この値はAFM観察による軸比よりも小さく、その原因の一つはナノファイバーが水中で屈曲しているためと推測された。

3. 脆弱化処理／機械的複合処理と酵素糖化性

我々はこれまで様々なリグノセルロースに対して、水熱処理と機械的解繊処理とを組み合わせた複合前処理を施すことによって、薬品を用いて脱リグニン処理をすることなく、酵素反応性が著しく改善されるという知見を得ている。この鍵を握るのは、水熱処理による、リグノセルロース組織でのミクロ・ナノサイズのボイドの形成である。ボイドの成形により、組織内部への水の浸透性が向上し湿式での機械的解繊処理が効率化する。ボイドの形成および高度な解繊による比表面積の増加によって酵素がセルロース等へ空間的にアクセスしやすくなるために、反応性が改善されたものと推測している。これらの成果については既報でまとめている³⁾。ここでは新たに行った実験結果を紹介する。

多くのリグノセルロースバイオマスの酵素糖化前処理の

Figure 3 Morphology of hot-compressed water (HCW)-treated products and subsequent disk-milled products.

中で、水熱処理は選択的にヘミセルロースを分解・溶出させる方法として良く知られている⁹⁾。ヘミセルロースのアセチル基の脱離によって生成した酢酸は、さらに反応を促進させることができる。いわゆる“自己加水分解 (auto-hydrolysis)”と呼ばれている反応である。我々は、180℃以下の比較的マイルドな反応温度でバイオマスを処理し、セミセルロースを部分的に分解し細胞壁の組織構造を脆弱化することで、機械的な解繊処理の効率を向上させる研究を行っている。水熱処理後のサンプルは乾燥させることなく常に湿潤状態を保ちながら機械的解繊までを行うことが重要である。

ヒノキとユーカリ木粉を原料として、滅菌用のオートクレーブを用いて150℃で2時間、水熱 (hot-compressed water; HCW) 処理を行った。水可溶分はヒノキが12.9 wt%，ユーカリが17.1 wt%であった。水熱処理後ディスクミル処理を5–10パス行い、各パスごとの処理時間を測定した。Figure 3には水熱処理後また機械的解繊処理後の生成物の電子顕微鏡写真を示す。水熱処理によって細胞壁に多くの空隙が見られており、またセルロースマイクロフィブリルが表面に露出していることが分かる。

この組織構造の緩みが機械的解繊処理の効率を向上させており、短いディスクミル時間でより効果的にセルロースマイクロフィブリルが細かくほぐされていることが分かる。このような変化により表面積が増加して酵素糖化率が向上すると考えられる。糖化反応に耐熱性エンドグルカナターゼと耐熱性ベータグルコシダーゼを用いた結果においても、水熱処理後に解繊処理することで糖収率が向上した。また、アクレモニウム産生酵素を用いた実験でも同じ結果が確認されている¹⁰⁾。

また、希アルカリ存在下での水熱処理と湿式ディスクミル処理を組み合わせた複合解繊処理についても検討している。サトウキビの搾りかす (バガス) を希アルカリ水溶液 (1–6%) に浸漬後150℃で2時間処理した。得られた処理物を固形分濃度5%としてディスクミルにより解繊し、酵素糖化試験を行った。その結果、アルカリの存在により湿式ディスクミルの処理時間およびエネルギー消費量 (粉碎動力) が減少することが分かった。また、水の水熱処理と比較して、アルカリ添加系では、酵素糖化率も向上していることが分かった¹¹⁾。

脆弱化処理としてのオゾン処理と機械的処理の複合解繊処理についても検討している。オゾン処理はラジカル反応であり位置選択的な反応制御は期待できないが、リグニンの炭素・炭素二重結合を効率よく切断し分解する能力がある。オゾン処理における原料のサイズ、水分量、オゾン濃度および発生量、処理時間、温度などの処理条件が、機械的解繊処理および酵素糖化性に及ぼす影響を検討した。これまでにスギ木粉を用いて種々のオゾン処理条件を検討

し、酵素糖化性を向上させる最適条件を見出している。スギ木粉の水分量40%，オゾン濃度204 mg/l，流量500 ml/minの条件下でオゾン処理時間は75分が最適であった。また、オゾン処理することで、短時間のディスクミル処理で生成物の比表面積を増加させ酵素糖化性が飛躍的に向上することを見出した。電子顕微鏡観察からナノスケールまで微細化されていることが分かった¹²⁾。

得られた解繊物の酵素吸着・分解挙動を水晶振動子天秤 (Quartz Crystal Microbalance, QCM) を用いて解析する研究も行っている。QCMは水晶振動子をセンサーとして用いて、サンプルを固定したセンサー面への分子の吸着や解離を質量変化として評価できる装置である。我々は種々の化学成分が異なるセルロースナノ繊維を用いてQCMセンサーを調製することに成功している。Figure 4に得られたQCMセンサーのAFM写真を示す。リグニンおよびヘミセルロースが存在してもセンサー表面に均一にナノ繊維がコーティングされていることが分かる。各種セルラーゼ (産総研のアクレモニウム産生の粗製セルラーゼおよび精製CBHI) を用いて、ナノ繊維の化学成分の違いが酵素吸着および分解挙動にどのように影響しているかを調べている。これまでに、リグニン量の増加により酵素吸着量は少なくなるが分解速度には大きく影響しないという結果を得ている。また、異なる水熱処理温度でヘミセルロース量を調整したナノ解繊物においては、ヘミセルロース量が増えるにつれて吸着量と分解速度は著しく減少していることが分かった¹³⁾。現在この予備実験結果を踏まえて、酵素吸着・分解挙動に及ぼすナノ解繊物の化学成分、結晶化度、比表面積などの影響や、セルラーゼの種類・組み合わせおよび濃度による影響を系統的に調べている。

Figure 4 AFM image of cellulose nanofibers coated on QCM sensor.

4. 終 わ り に

以上、我々がこれまで行ってきたリグノセルロースの機械的解繊処理による微細繊維化技術、微細繊維の酵素糖化、微細繊維を用いたナノコンポジットに関する研究開発について紹介した。異なる性質を持った微細化繊維への各種セルラーゼの吸着・分解挙動解析、大量の水を含むナノ解繊物の樹脂への均一ナノ分散技術は、現在重点的に研究を行っている。機械的解繊手法については実的なバイオエタノール生産プロセスへの適応も進めている。今後、活発な事業展開に着手している企業との連携を強化して、用途に合わせたナノ繊維の経済的な生産法の確立、特性評価、ナノコンポジットの性能に直結するフィラーの分散性および界面特性評価などの研究をさらに深めていきたい。

References

- 1) Lee, S.H.; Teramoto, Y.; Endo, T.: *Cellul. Commun.*, **18** (1), 12-17 (2011)
- 2) Lee, S.H.; Iwamoto, S.; Kim, H.W.; Ishikawa, K.; Endo, T.: *Kinozairyo*, **32** (2), 48-53 (2012)
- 3) Endo, T.: *Synthesiology*, **2**, 310-320 (2009)
- 4) Yamamoto, S.; Lee, S.H.; Endo, T.; Iwamoto, S.: The 20th Polymer Materials Forum, The Society of Polymer Science, Japan, 196 (2011)

- 5) Iwamoto, S.; Lee, S.H.; Endo, T.: International Cellulose Conference 2012, 211 (2012)
- 6) Lee, S.H.; Teramoto, Y.; Endo, T.: *Composites: Part A*, **42**, 151 (2011)
- 7) Nge, T.; Lee, S.H.; Teramoto, Y.: 59th Annual Meeting of the Japan Wood Research Society, 137. (2009)
- 8) Iwamoto, S.; Lee, S.H.; Endo, T.: 62th Annual Meeting of the Japan Wood Research Society, 156. (2012)
- 9) Ando, H.; Sasaki, T.; Kokusho, T.; Shibata, M.; Uemura, Y.; Hatate, Y.: *Ind. Eng. Chem. Res.*, **39**, 3688 (2000).
- 10) Lee, S.H.; Chang, F.; Inoue, S.; Endo, T.: *Biores. Tech.*, **101**, 7218 (2010).
- 11) Miura, T.; Lee, S.H.; Inoue, S.; Endo, T.: *Biores. Tech.*, **105**, 95-99 (2012)
- 12) Miura, T.; Lee, S.H.; Inoue, S.; Endo, T.: *Biores. Tech.*, **126**, 182-186 (2012)
- 13) Kumagai, A.; Lee, S.H.; Endo, T.: International Cellulose Conference 2012, 175. (2012)

日本語表記参考文献

- 2) 李 承桓; 岩本伸一郎; 金 翰佑; 石川一彦; 遠藤貴士: 機能材料, **32** (2), 48-53 (2012)
- 4) 山本茂弘; 李 承桓; 遠藤貴士; 岩本伸一郎: 第20回ポリマー材料フォーラム, 196 (2011)
- 7) Nge, T.; 李承桓; 遠藤貴士: 第59回日本木材学会大会予稿集, 137 (2009)
- 8) 岩本伸一郎; 李 承桓; 遠藤貴士: 第62回日本木材学会大会予稿集, 156 (2012)

李 承桓; 江原大学校森林環境科学大学森林バイオ素材工学科, 助教授 (農学博士) (韓国江原道春川市孝子2洞192-1). 2000年京都大学大学院農学研究科博士. 2004-2006 テネシー大学研究員. 2006-2012 産業技術総合研究所主任研究員. 2008年よりテネシー大学客員助教授 (兼任). 専門: 木材化学, バイオエネルギー.

遠藤 貴士; 独立行政法人 産業技術総合研究所 バイオマスリファイナリー研究センター, 研究チーム長 博士 (理学) (〒739-0046 広島県東広島市鏡山3-11-32). 1992 広島大学大学院理学研究科修了, 博士 (理学). 1992 通商産業省工業技術院四国工業技術研究所入所. 1996 同所主任研究官. 2001 組織改革により独立行政法人産業技術研究所 主任研究員. 2005 同所 バイオマス研究センター 研究チーム長. 2012 同所 バイオマスリファイナリー研究センター 研究チーム長. 専門: セルロース化学, 高分子化学.

岩本 伸一郎; 独立行政法人産業技術総合研究所 バイオマスリファイナリー研究センター, 研究員, 博士 (農学) (広島県東広島市鏡山3-11-32). 2008年 京都大学大学院農学研究科森林科学専攻博士課程修了, 博士. (農学) 取得. 2008~2011年 東京大学農学生命科学研究科特任研究員. 2011年~現在 独立行政法人産業技術総合研究所研究員. 専門: 木質材料, セルロース