

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：25406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13352

研究課題名(和文) バイオプロセスによるII-VI族量子ドット半導体合成法の開発

研究課題名(英文) Development of II-VI group q-dot semi-conductive materials based on bioprocess

研究代表者

阪口 利文 (SAKAGUCHI, TOSHIFUMI)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：10272999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CdSeのような蛍光性半導体のような微粒子は、その材料・物理特性から分子キャリア、記録材料、光伝導体、光電池などその利用価値が多岐に及んでいる。そのため、量子ドットナノ粒子の簡便な合成方法が望まれている。本研究では、微生物によるセレン・テルルオキシアニオンの還元バイオプロセスによるII-IV族化合物半導体微粒子合成に関する研究を実施した。その結果、海洋で採取された魚類から分離された *Shewanella* sp. KND-1株をセレン酸と重金属類を共存させて培養することでセレンとコバルトなどの金属類のアモルファス状塊を形成できた。また、好氣的な条件でもアモルファス状塊を形成可能であった。

研究成果の概要(英文)：Luminescent semi-conductive nano-spheres as CdSe and CdTe can be widely applied to various industrious devices such as molecular carrier, memory device, photo-conductive material, photo-cells and so on. Its usage are varied. Therefore, it is being expected to develop the simple and easy synthetic method of quantum dot nanoparticles, which can be avoided the conventional method. In this study, we have attempted to develop the new method based on bioprocess with microbes capable of reducing Se- or Te-oxyanions, to synthesize II-VI group semi-conductive contained Se or Te. We have found and confirmed by the TEM observation and the EDS analysis, that new marine isolate, *Shewanella* sp strain KND-1, could synthesize amorphous nano-depositions that contained Se and metal such as Pb, Co and Ni by incubating the cells under selenate and heavy metal anion co-existing condition. These results suggested that our isolate is available for the synthesis of Se and metal contained fine particles.

研究分野：応用微生物学

キーワード：化合物半導体 微生物 セレン ナノ微粒子 微生物合成

1. 研究開始当初の背景

蛍光性半導体のような微粒子は、ナノパワティクルとしての材料・物理特性から分子キャリア、記録材料、分離素材、光伝導体、光電池など幅広く工業的に用いられており、その利用価値が多岐に及んでいる。一例を挙げれば、CdSeのようなセレン・テルルを含むII-IV族半導体はバンドギャップを変化させることで有機系色素にはない特性を現し、発光半導体(量子ドット: Q-Dot)として注目されている。粒径による発光制御が可能であり、ナノメートルオーダーの量子ドットは結晶デバイス材料のみならず、ナノ蛍光タグとして生化学分野での応用が期待されている。そのため、既存の特許法を回避した量子ドットナノ粒子の簡便な合成方法が望まれている。申請者らは微生物によるセレン・テルルオキシアニオンの不溶性化回収に関する研究を進める中で、微生物の酸化還元代謝を用いてCdSe、CdTeのナノ微粒子ができることを確認した(阪口、松本:特開2005-341817)。これらの研究では本現象を排水中に含まれる重金属イオンと枯渇が懸念されるセレン、テルルなどのレアアース元素の同時回収に利用することが目的であったが、微生物を用いたバイオプロセスによるセレン・テルルを含むII-IV族半導体微粒子合成法として着想した。

2. 研究の目的

本研究では、まず、バイオプロセスによる微粒子合成に関わる基礎的事項について明らかにするために、CdSe、CdTeを中心にII-IV族半導体微粒子合成に関与する微生物の特定をはじめ、合成条件の把握、高分解能電子顕微鏡観察による合成場所の特定、培養液や菌体から効率的な微粒子抽出法の開発に関する研究を開始する。次に、カドミウム以外の重金属カチオンを用いたII-IV族半導体化合物半導体結晶の合成についても検討する。更に生成したナノ微粒子に対する元素分析、結晶回折法などを用いて結晶特性を評価するとともに、バイオプロセスによる結晶化条件、Q-Dot効果が見られる粒径制御の可能性を明らかにする。また、生成微粒子の発光性を検証し、発光性ナノ微粒子材料デバイスとしての利用可能性について明らかにする。

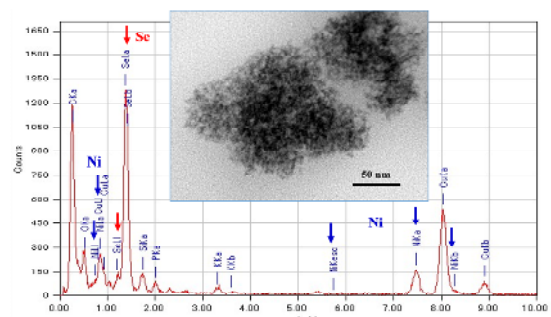
3. 研究の方法

研究行程としてはセレン・テルルオキシアニオン還元に関わる微生物代謝を異化・同化両側面から推測しながら培養条件を変化させることで微粒子合成に最適な条件を見出す。本実験においては異化的条件では嫌気呼吸、同化的プロセスを利用する場合には好気条件での合成条件を明らかにする。酸化還元電位やセレン・テルルオキシアニオン、重金属イオンの添加濃度とインキュベーションにおける添加タイミングなど合成条件パラメーターを明確化して本実験にあたる。バッチ系

における培養での重金属イオンから微粒子への変換効率を調査し、効率的な微粒子変換条件を明らかにする。本分析にはイオンクロマトグラフィーなどを用いて、添加した重金属や金属様オキシアニオンの除去・減少率、菌体内外から生成される微粒子を抽出、生成量などを調査し、微生物株による微粒子合成効率の最適培養条件を明らかにする。また、Q-Dot微粒子への活用を考え、培養細胞や抽出微粒子に対して逐次、透過型電子顕微鏡による簡易的な形態観察を行うことで、培養各段階や時間経過における微粒子形成の状況について調査する。

4. 研究成果

まず、本研究の進展で重要な位置を占めると予想された研究支援予定者であった本学所属機関の矢間太准教授の急逝によって、所属機関における逐次電子顕微鏡観察実験の実行が困難になったこと、及びCdSeなどの含セレン微粒子の合成を予定したCdSeSR-1株の不調によって、初年度は、研究遂行への影響がみられたもの、新潟県の原油湧出地から独自に分離した*Enterobacter cloacae* strain SM9株を用いたCdTeを中心としたII-IV族化合物半導体についてその合成条件を調査したところ、その合成には嫌気的な条件設定が必要であり、嫌気呼吸鎖との関連性が示唆される結果が得られた。これに対して、好気的な条件でセレン・テルルオキシアニオンに対して還元能を有することを新たに見出した放線菌(*Flexivirga alba*)やカビ類(*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus luchuensis*)では、好気条件で培養された培養液へのセレン・テルルオキシアニオンと金属イオンの中途添加によってセレン・テルルを含む微粒子の形成が確認され、化合物半導体合成の可能性が示された。しかしながら、カドミウムを含むCdSe、CdTe様微粒子の合成については、カドミウムの毒性による生育・活性阻害が強く、目的沈殿物の生成はできなかった。目的微粒子の生成成功例としては、添加後、長期(300時間程度)にわたってインキュベートした場合では放線菌*Flexivirga alba*の培養液に亜セレン酸とニッケルイオンを添加したところ、ナノサイズレベルのニッケルとセレンのアモルファス塊の複合体の形成が認められた(図1)。



亜セレン酸とニッケルイオンを各1 mMで添加後133時間の振とう培養(25°C, 120 rpm)及び193時間の静置培養を継続して行った菌体に対して観察・分析を実施した。
 C_Kのシグナルはグリッドメッシュ由来、TEM (JEM-2010, Jasco), EDS (JED-2300T, Jasco)
 図1 放線菌*Flexivirga alba*によって生成した微粒子の透過型電子顕微鏡(TEM)観察、及びEDSによる元素解析

次に、セレンディピティとも言える副次的な研究成果ではあるが、本実験に使用した微生物の培養液や培養菌体を用いて有害なセレン・テルルオキシアニオンを元素体のセレン・テルルとして極めて迅速かつ簡便に回収できることが判明した。特に黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*)、黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) が最小培地で形成する菌塊をセレン・テルルの回収に利用したところ、亜セレン酸を好気振盪条件で極めて迅速に元素体セレンに還元変換でき、要する時間は0.1mMの初発濃度で30分から1時間以内、1.0mMの場合でも10時間から12時間であり、添加されたほぼすべての亜セレン酸をその菌塊内に回収できることが判明した(図2)。更

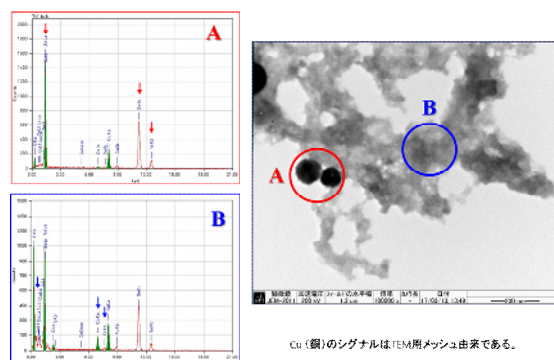
Hour	Potato dextrose medium (PD)	PD + 0.1 mM Se(IV)	PD + 0.2 mM Se(IV)	PD + 0.3 mM Se(IV)	PD + 0.5 mM Se(IV)	PD + 1 mM Se(IV)
0						
0.5						
1.0						
3.0						
6.0						
24.0						

ポテトデストロース培地で30℃、45時間、120rpmの振盪条件で黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を培養して、麹菌の菌塊を形成させた。形成させた菌塊に亜セレンを各濃度で添加後、30℃、120rpmの振盪条件を継続させながらセレン回収を行った。

図2 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* による迅速なセレン回収(回収液外観)

に、テルル回収でも同様に元素体テルルとして取り込み回収が可能であることが判明している。これらの成果については特許出願までに至ることができた。

細菌・カビ類・酵母などの既存微生物株の他にも、海洋をはじめ、新たに様々な環境から、化合物半導体の合成が期待できる菌株の探索を実施した。また、対象となるカチオンとしても、環境中からの回収が望まれる鉛、戦略元素であるニッケル、コバルト、亜鉛、各イオンを培養液中にセレン・テルルオキシアニオンとともに添加することで、PbSe (PbTe), NiSe (NiTe), CoSe (CoTe), ZnSe (ZnTe)などの化合物半導体結晶の合成・変換について検討した。その結果、報告者らが独自に東シナ海で採取されたカナド (カナガシラ: *Lepidotrigla guentheri*) の内臓から分離された *Shewanella* sp. KND-1株をセレン酸、もしくは亜セレン酸と重金属類を共存させながら培養することで、菌体内にセレンと鉛、コバルト、ニッケルなどの重金属類のアモルファス状塊を形成できることが、広島大学との共同研究に基づく電子顕微鏡観察、元素分析、回折像観察によって明らかになった(図3)。これらのアモルファスナノ微粒子において、添加重金属はセレンとともに検出され、セレンとの何らかの結合の存在を示唆していた。更に将来的には菌体をそのまま窒素還流下で還元的に焼成させることで目的の化合物半導体微粒子を効率的に得ることが出来ると考えられた。加えて、本分離株はマリンプロスを増殖培地として嫌気、好気両条件で生育、(亜)セレン酸の還元が可能であるため、



セレン酸と金属イオン(コバルトイオン)はそれぞれ1mM濃度で添加された。
図3 海洋細菌 *Shewanella* sp. KND-1株によって形成された微粒子の透過型電子顕微鏡観察とその元素解析(EDS)

好気的な条件でもアモルファス状塊を形成可能であった。また、同様な条件でのテルル酸の還元も可能であり、テルルを含む金属アモルファスナノ微粒子をも合成できる可能性が示唆され、バイオプロセスによる目的となる化合物半導体の簡便化が期待できる研究成果が得られた。

<引用文献>

阪口利文、松本光史：特開 2005-341817、2005年

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0件)

現在、掲載にまで至ったものはない。

[学会発表] (計16件)

- ① Keisuke Nagatomi, Tatsuya Hiraoka, Kanako Ishikawa, Yoshiko Okamura, Hideaki Miyashita and Toshifumi Sakaguchi, Isolation and characterization of a selenite-requiring microbe, *Bacillus* sp. strain BSA-1 isolated from the deep sediment in Lake Biwa, 13th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE 2015 FUKUOKA), Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan, 2015年7月12日~2015年7月16日
- ② Toshifumi Sakaguchi, Recovery and Conversion of Chalcogen Element by a Filamentous Fungus for Food Processing, *Aspergillus oryzae* Strain RIB40, The 6th International Conference of Green Technology (GREENTECH 2015), State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim, Malang, Indonesia, 2015年9月18日~2015年9月19日
- ③ Toshifumi Sakaguchi, Hiromi Kimura, Miyu Nagaoka, Toshi-hide Arima, Yoshiko Okamura, Makoto Maeda, Aerobic reduction of selenite by a filamentous fungus, *Aspergillus oryzae* for selenium

- recovery and recycling, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Honolulu, Hawaii, 2015年12月15日～2015年12月20日
- ④ 馬越智也、木村博美、樋口隼平、杉山友康、岡村好子、阪口利文、六価クロム還元性放線菌 *Flexivirga alba* ST13 株の培養菌体を用いた好気条件におけるセレン・テルルオキサニオンの還元・回収、日本化学会、第9回 バイオ関連化学シンポジウム、熊本大学工学部 黒髪南地区キャンパス、2015年9月10日～2015年9月12日
- ⑤ 木村博美、有馬寿英、永岡美優、岡村好子、阪口利文、*Aspergillus oryzae* の菌体顆粒を用いた簡易型バイオリクターによるセレン回収、第67回 日本生物工学会大会、鹿児島市城山観光ホテル、2015年10月26日～2015年10月28日
- ⑥ 阪口利文、永岡美優、有馬寿英、木村博美、好気条件における黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* RIB2604 株によるセレンオキサニオン変換とセレン回収、日本農芸化学会 2016年度(平成28年度)大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月27日～2016年3月30日
- ⑦ 馬越智也、内田菜月、石川輝、田口和典、阪口利文、外洋から得られた海洋生物からの好氣的セレン・テルルオキサニオン還元菌の探索、及びキャラクター化セッション、第18回マリンバイオテクノロジー学会、北海道大学水産学部・函館キャンパス、2016年5月28日～2016年5月29日
- ⑧ Toshifumi Sakaguchi and Tomoya Umakoshi, Tellurium conversion and recovery by marine microbes, International Conference on Food, Agriculture, and Natural Resources (FANRes 2016), Brawijawa University, Malang, Indonesia, 2016年8月2日～2016年8月4日
- ⑨ 阪口利文、有馬寿英、鬼塚彩華、田中星奈、岡崎舞、麹菌による元素資源回収の可能性、日本化学会第10回バイオ関連化学シンポジウム 第31回生体機能関連化学シンポジウム、第19回バイオテクノロジー部会 シンポジウム、石川県立音楽堂、もてなしドーム地下イベント広場、金沢、石川、2016年9月7日～2016年9月9日
- ⑩ 阪口利文、内田菜月、馬越智也、田中星奈、鬼塚彩華、岡村好子、石川輝、田口和典、海洋生物試料からの好氣的セレン還元性微生物の分離と培養、第68回 日本生物工学会、富山国際会議場、富山、2016年9月28日～2016年9月30日
- ⑪ Toshifumi Sakaguchi, Application of marine microbes to the recovery and conversion of chalcogen elements, The 7th International Conference Green Technology, University Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Indonesia, 2016年10月5日～2016年10月6日
- ⑫ 阪口利文、勢水丸航海を通じた元素回収用海洋微生物の探索と乗船学生の人間形成への貢献、練習船「勢水丸」教育関係共同利用拠点シンポジウム 「美味し国・三重からの発信」(招待講演)、三重大学総合研究棟Ⅱメディアホール、2016年12月22日
- ⑬ 阪口利文、田中星奈、馬越智也、岡村好子、石川輝、田口和典、海洋生物から分離された好気性セレン酸還元菌の諸性質、日本農芸化学会 2017年度大会、京都女子大学、京都、2017年3月17日～2017年3月20日
- ⑭ Toshifumi Sakaguchi, Seina Tanaka, Tomoya Umakoshi, Yoshiko Okamura, Akira Ishikawa and Kazunori Taguchi, Aerobic selenate reduction by *Shewanella* sp. strain KND-1 was isolated from the intestines of a searobin, *Lepidotrigla guentheri* which was captured in East China Sea, The 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC) 2017, Hawaii University & Hawaii Imini International Conference Center at Jefferson Hall, Honolulu, Hawaii, USA, 2017年5月22日～2017年5月24日
- ⑮ 阪口利文、海洋細菌によるセレン酸還元と微粒子形成、第3回日本セレン研究会、北里大学薬学部、港区、東京、2017年5月27日～2017年5月28日
- ⑯ 阪口利文、田中星奈、馬越智也、石川輝、田口和典、岡村好子、東シナ海から漁獲されたホウボウ(カナド)内臓から分離された好氣的セレン酸還元菌のキャラクター化セッション、第19回マリンバイオテクノロジー学会大会、東北大学、青葉山新キャンパス、仙台、宮城、2017年6月3日～2017年6月4日

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：セレン含有物質の浄化処理方法
 発明者：山澤哲、阪口利文、木村博美、有馬寿英、岡村好子
 権利者：鹿島建設株式会社
 種類：特許出願、特許公開
 番号：特願2015-131167 (P2015-131167)
 : 特開2017-12984 (P2017-12984A)
 出願年月日：2015年6月30日
 (特許公開日：平成29年1月19日)
 国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

現在のところ該当するものがない。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口利文 (SAKAGUCHI Toshifumi)

県立広島大学・生命環境学部・生命科学科・

教授 研究者番号：10272999

(2) 研究分担者

富永依里子 (TOMINAGA Yoriko)

広島大学・先端物質科学研究科・助教

研究者番号：40634936

岡村好子 (OKAMURA Yoshiko)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：80405513