

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：53203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05590

研究課題名(和文) 微生物が生産する新規キレート剤を利用したメッキ排水からの有用金属回収法の開発

研究課題名(英文) Screening for novel siderophores and their application to nickel recovery from plating industry wastewater

研究代表者

篠崎 由紀子 (SHINOZAKI, Yukiko)

富山高等専門学校・物質化学工学科・准教授

研究者番号：60727113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が生産するキレート剤(シデロフォア)を利用したメッキ排水からの有用金属回収法の開発を目的として、シデロフォア生産菌の探索を行った。取得した菌株(Delftia sp.)のシデロフォアを用い、疎水性担体に吸着させる簡便な方法にて、水溶液中のニッケルイオンの回収を検討した。粗抽出したシデロフォアを用いてメッキ工場の排水からニッケル回収を行った結果、添加したシデロフォア濃度と同程度のニッケルが回収できた。

研究成果の概要(英文)：We have been exploring non-iron metal-chelating siderophores with the aim of developing a simple metal recovery method from plating industry wastewater. Here we report the results of screening for siderophore-producing bacteria and their application to Ni recovery from an aqueous solution.

研究分野：応用微生物学

キーワード：シデロフォア メッキ ニッケル リサイクル

1. 研究開始当初の背景

本研究で着目したメッキの工場では、被メッキ物表面に付着した処理液を次の工程に持ち込まないために、各処理間における水洗工程が重要である。この水洗工程において、ニッケルや亜鉛などの有用な金属を含んだ排水が発生する。これら排水中の金属は工場内の排水処理施設において、苛性ソーダや消石灰に加えて高分子凝集剤などの多量の薬剤を投入する中和沈殿により除去されている(図1上)。その際に生成する污泥(スラッジ)は含水率が高く、脱水処理した後も一般に60%以上の水分を含んでいる。このメッキスラッジの埋め立て処分費用は年々高騰していることから今後メッキ事業者の大きな経営負担となることが予想され、メッキスラッジの減量化が重要な課題となっている。一方で、メッキ産業で主に用いられている金属の多くはレアメタルに分類され、国際的な獲得競争が熾烈を極めている。先述の排水やスラッジにも多くの有用金属が含まれるため、一部の廃棄物処理会社等では、スラッジからの有用金属の回収が始まったところであるが、現段階では多くのメッキスラッジが、金属が回収されないまま有償で埋め立て処分されている。

2. 研究の目的

上記の問題を解決するために本研究では、微生物が生産するキレート剤に着目し、これを利用したメッキ排水からの有用金属回収法の開発を目的とした。

微生物は鉄欠乏下において、シデロフォアと総称される鉄キレート剤を種特異的に生産し、生育に必要な鉄イオンを効率よく取り込むことが知られている。これまでシデロフォアは、3価の鉄イオンに対して高いキレート作用を示し、鉄以外の2価の金属イオンに対するキレート作用は低いと考えられてきた。しかし近年では、鉄以外の金属に対しても高いキレート作用を示すシデロフォアが見出されており(そのようなシデロフォアはメタロフォアとも呼ばれる)その生産菌は有害な金属イオンに対して耐性を示すことが報告されている(Johnstone and Nolan,

Dalton Trans., 44, 6320-6339, 2015)。これまでに約500種類のシデロフォアが見出されているが、その金属耐性と関連や鉄以外の金属に対するキレート作用についての知見は未だ少ない。

シデロフォアは入手が容易な原料からの低コスト大量生産が可能であること、微生物が本来自然環境中で生産している天然の化合物であることから、費用対効果の高い環境低負荷型の金属回収法の基盤技術になると期待できる。本研究では、スラッジを生成しない新規処理法として、シデロフォア固定化担体等を用いたメッキ排水からの金属回収法(図1下)の開発を最終目標として、以下の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) シデロフォア生産菌の単離

ニッケルイオンをキレートするシデロフォアの生産菌は、比較的高濃度のニッケル存在下でも生育可能と予想される。そのため一次スクリーニングとして、NiCl<sub>2</sub>を添加した細菌用栄養培地に、身近な土壌を分離源として加え集積培養を行い、ニッケル耐性菌を単離した。二次スクリーニングとして、得られたニッケル耐性菌のシデロフォア生産性を、一般的な手法であるCASアッセイ(Schwyn and Neillands, Anal., Biochem., 160: 47-56, 1987)により判定した。

(2) 水溶液からのニッケル回収

取得した菌株が生産するシデロフォアを用いて、簡便な方法にて水溶液中のニッケルイオンの回収が可能か検討を行った。試薬のNiCl<sub>2</sub>を含む水溶液にシデロフォア粗抽出物を添加して室温で30分静置した後、この水溶液を疎水性のカラム(Sep-Pak Plus C<sub>18</sub>, Waters)に通し、カラム非吸着画分と、吸着・希塩酸で溶出画分として回収し(図2)それぞれのニッケルイオン濃度を、ジメチルグリオキシムを用いた比色定量法にて測定した。

また、モデル排水として、無電解ニッケルメッキ液を100倍に希釈した水溶液を用い、同様の方法にてニッケルイオンが回収可能か検討を行った。

ニッケル回収の操作をさらに簡便にするため、シデロフォアを固定化した担体の作製を試みた。粗抽出したシデロフォアを予め疎水性の担体に吸着させたシデロフォア固定化担体を作製し、そこにニッケルを含む水溶液を流し込みニッケルが回収できるか検討を行った。

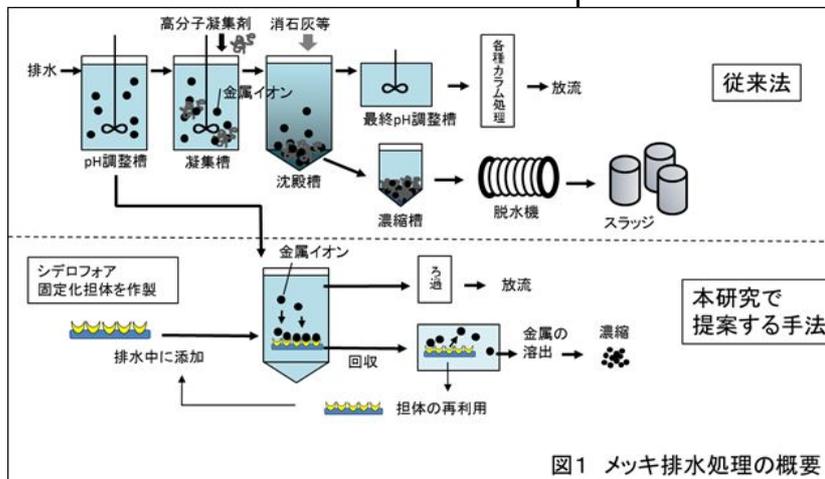
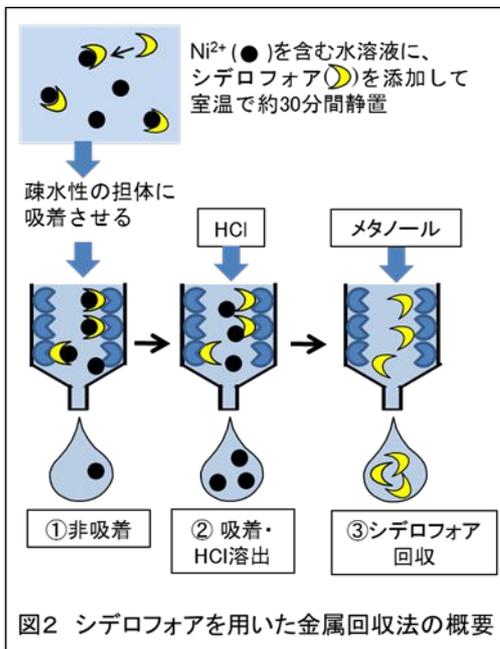


図1 メッキ排水処理の概要



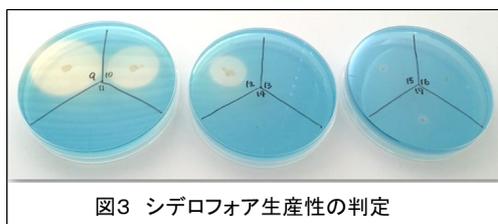
### (3) シデロフォア精製条件の検討と分子量解析

培養上清から疎水性の担体 (Amberlite XAD-2, Supelco) を用いてシデロフォアを抽出・濃縮した後、イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。得られたシデロフォア活性画分を LC-MS 分析に供した。

## 4. 研究成果

### (1) シデロフォア生産菌の単離

一般的な土壌を分離源としてスクリーニングを行った結果、9種類のニッケル耐性菌を取得し、そのうちの5菌株がシデロフォアを生産した(図3)。シデロフォアの生産量が多く、疎水性のカラムでシデロフォアを回収可能な菌株 (*Delftia* sp.) を選抜し、以降の実験に用いた。



### (2) 水溶液からのニッケル回収

試薬の NiCl<sub>2</sub> を含む水溶液にシデロフォア粗抽出物を添加して室温で30分静置した後、この水溶液を疎水カラムに通し、カラム非吸着画分および、吸着(希塩酸で溶出)画分として回収し、それぞれのニッケルイオン濃度を測定した。その結果、コントロール(シデロフォア非添加, 図4上)に比べ、シデロフォアの添加によってニッケル濃度が低下した(図4下)。この結果から、シデロフォアがニッケルイオンをキレートした状態で疎水カラムに吸着したと考えられた。そ

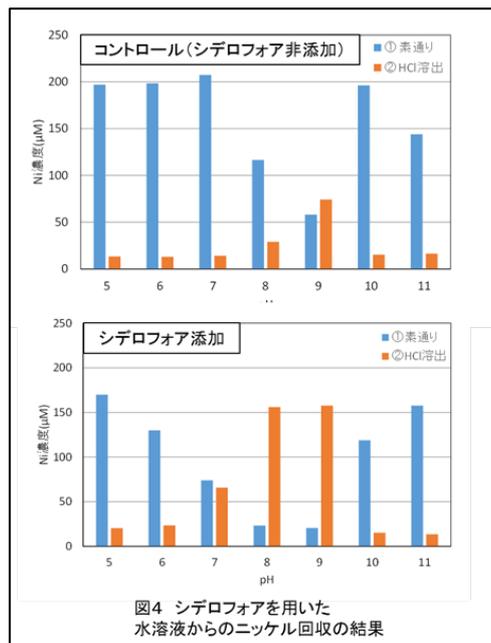
こに希塩酸を流して溶出・回収したの溶液にはニッケルイオンが含まれており、pH8.0の条件下で回収されたニッケルイオンの量は、添加したシデロフォア濃度から推定される量とほぼ一致した。

また、モデル排水として、無電解ニッケルメッキ液を100倍に希釈した水溶液を用い、同様の方法にて予備検討を行った結果、約550 mLの培養液から抽出したシデロフォアを用い、無電解ニッケルメッキ液1.0 mL(約4.7 mgのニッケルを含む)から、1.5 mgのニッケルイオンを回収できた。

疎水カラムに吸着したシデロフォアは、メタノールにて溶出・回収し再利用が可能であった。

一方で、ニッケル回収の操作をさらに簡便にするため、シデロフォアを固定化した担体の作製を試みた。粗抽出したシデロフォアを予め疎水性の担体に吸着させたシデロフォア固定化担体を作製し、そこにニッケルを含む水溶液を流し込みニッケルが回収できるか検討を行った。その結果、吸着させたシデロフォア量から予想される量よりも、実際に回収されたニッケルの量が少ないことが分かった。

今後、シデロフォア固定化担体の作製については、取得したシデロフォアの構造決定を行い、その情報を元に化学結合による固定化法を検討する必要がある。



### (3) シデロフォア精製条件の検討と分子量解析

イオン交換クロマトグラフィーにより分取したシデロフォア活性画分を LC-MS 分析した結果、分子量 1250~1330 の化合物が複数含まれていた。これらは、*Delftia acidovorans* が生産する既知のシデロフォア (delftibactin) (Johnston et al. Nat. Chem. Biol. 9, 241-243, 2013) の分子量とは異なる

り、新規なシデロフォアである可能性が示唆された。今後はシデロフォアの構造決定のために、さらなる精製操作を行う予定である。

#### 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)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Phylogenetic diversity of metal resistant soil bacteria and exploration of a new siderophore produced by a  $\text{Co}^{2+}$ -resistant bacterium of the genus *Pandoraea*

Dandan Li, Yukiko Shinozaki, Naoya Oku, Ryo Kanemaru, Yasuhiro Igarashi、日本農薬学会 第42回大会、平成29年3月6日~3月8日愛媛大学城北キャンパス

2. 新規シデロフォアのスクリーニングと排水からのニッケル回収への利用

保里明日香、坪田洸一郎、袋布昌幹、篠崎由紀子、日本生物工学会 2016年度大会  
平成28年9月28日~9月30日、富山国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

篠崎 由紀子 (SHINOZAKI, Yukiko)

富山高等専門学校・物質化学工学科・准教授  
研究者番号：60727113

(2)研究分担者

袋布 昌幹 (TAFU, Masamoto)

富山高等専門学校・物質化学工学科・教授  
研究者番号：50270244

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし