

平成 30 年 5 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14462

研究課題名(和文)細胞表層の界面制御によるレアメタル高度分離材料の創成

研究課題名(英文)Development of novel biosorption based on design of cell surfaces for separation of rare earths

研究代表者

後藤 雅宏 (GOTO, MASAHIRO)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：10211921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：バイオソープションは、環境への負荷が小さいため、金属回収法の新たな方法として注目されている。特に大腸菌はそれ自身が容易に増殖する点、さらには細胞表面に様々な金属吸着選択性に関わる官能基を有していることから、次世代型の金属吸着剤としての応用が期待されている。しかし、大腸菌をそのまま吸着剤として用いると、吸着量や吸着傾向がその細胞膜の組成に大きく依存する。そこで本研究では、その吸着能力と選択性の向上を細胞の表層を改変することを目指した。ジグリコールアミド酸型配位子を大腸菌へ化学修飾することにより、新たなバイオ吸着剤を創成し、希土類金属への選択性およびその吸着容量を向上させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Biosorption has recently attracted much attention as an alternative to conventional techniques for the recovery of rare earth elements (REEs). In this study, the surface of *Escherichia coli* (*E. coli*) was chemically modified to improve its performance as a biosorbent for REEs. The diglycolic amic acid group, which shows high affinity to REEs, was introduced by succinylation of the amine groups on the surface of the *E. coli*. Adsorption curves using the chemically modified *E. coli* were characteristic of the diglycolic amic acid group. The adsorption performance for transition metal ions was not affected by the chemical modification. These results suggest that modification of *E. coli* with a functional group with high affinity to REEs increases the effectiveness of adsorption. The maximum uptakes of REEs on the modified *E. coli* were increased to double. Chemical modification of *E. coli* is an effective method for enhancing the adsorption performance for REEs.

研究分野：分離工学

キーワード：レアメタル 希土類 リサイクル バイオソープション イオン交換 吸着樹脂 バイオ吸着 金属分離

### 1. 研究開始当初の背景

近年、安定的に採掘可能な鉱山が少ないことなどから希土類金属の価格が非常に高騰しており、これらの供給構造は非常に脆弱なものとなっている。そこで、資源の少ない日本にとって、廃家電など工業廃棄物が新たな金属資源として注目されている。しかし、複雑な組成であるそれらの廃棄物資源から目的金属のみを分離回収するのは容易ではない。したがって、そうした工業廃棄物からのレアメタルの高効率な分離回収法の確立が急務とされている。

金属の回収法には、従来、沈殿生成や溶媒抽出などの物理化学的回収法が用いられてきた。これらは、非常に便利な方法であり、複数の金属イオン溶液から目的金属を分離できるなど優れた利点を有している。しかし、欠点として、環境負荷が大きい点や高コストである点が挙げられる。この欠点を解決する金属回収の新しい方法として、生物学的回収法(バイオ吸着またはバイオソープション)が注目されている。本研究では、様々な分野で用いられているため入手しやすく、培養が容易で無限に複製することが可能な大腸菌をレアメタルの吸着剤として選択した。

### 2. 研究の目的

中でもバイオソープションは、従来用いられている溶媒抽出法より環境への負荷が小さいため、金属回収法の新たな方法として注目されている。特に大腸菌はそれ自身が無限に増殖する点、さらには細胞表面に様々な金属吸着選択性に関わる官能基を有していることから、環境負荷の小さいことも含めて次世代型の金属吸着剤としての応用が期待されている。また、吸着剤の合成が非常に容易であり、安価な吸着剤と成り得ることが期待されるため、産業界にもインパクトが大きいと思われる。しかし、大腸菌をそのまま吸着剤として用いると、吸着量や吸着傾向がその細胞膜の組成に大きく依存する。そこで、本研究では、細胞の表層を改変することによって、その吸着能力と選択性の向上を目指した。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 細胞表層吸着剤の調製

まず、ジグリコールアミド酸型配位子を有する Polymer 1 を合成した (Fig. 1)。次に、凍結乾燥した大腸菌に対して Polymer 1 を修飾した。まず、Polymer 1 を溶解させた超純水 (pH 3.0) に大腸菌を添加して室温で 2 時間攪拌した。続いて、1-(3-dimethylamino propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride を添加し、pH を 4.75 に調製した後、室温で 2 時間攪拌した。これにより、大腸菌のアミノ基とジグリコールアミド酸型配位子のカルボキシル基を反応させた。菌体を遠心分離により回収し、HCl (0.1 M) で 2 回、超純水で 1 回洗浄し、一晚凍結乾燥することで吸着剤を得た。

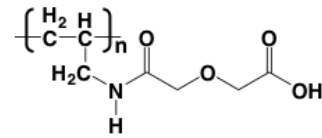


Fig. 1 細胞表層修飾剤の分子構造 (polm.1)

#### 3-2. 吸着・脱着実験

原料水相は、金属源として 1000 ppm 標準溶液を用い、0.1 M HEPES 溶液により各金属濃度を適宜調製した。1M または 0.1 M HNO<sub>3</sub> および 1 M NaOH により水相の初期 pH を調製した。ポリプロピレン製遠沈管に原料水相 2.5 mL と吸着剤 5 mg を加え、30 秒間 vortex mixer をかけ、30°C の恒温槽中で 60 分間、160 rpm の条件で振とうさせた。振とう後、吸着剤の遠心分離をし、さらに、0.20 μm のフィルターでろ過を行い、水相を分取した。分取した水相の pH を測定し、反応前後の水相中の金属イオン濃度を ICP 発光分析装置で測定した。また、吸着残渣を回収し、HNO<sub>3</sub> (1 M) を用いて脱着実験を行った。

吸着率 (A) と脱着率 (D) は、Eq. (1) 及び Eq. (2) により算出した。ここで、C: 金属イオン濃度 (ppm)、V: 溶液の体積 (L)、M: 吸着剤の質量 (g) をそれぞれ示す。ただし、i: 初期、e: 平衡時を表す。

$$A = (C_i - C_e) / C_i \dots \text{Eq. (1)}$$

$$Q = V(C_i - C_e) / M \dots \text{Eq. (2)}$$

### 4. 研究成果

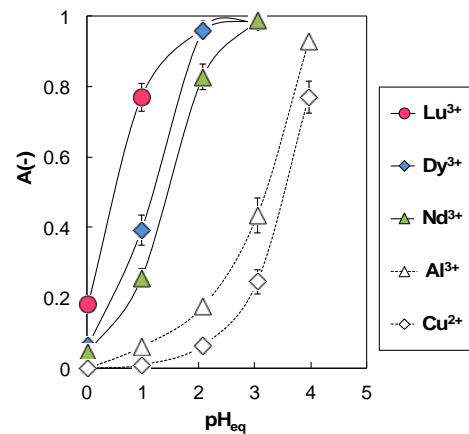


Fig. 2 吸着率に対する pH の影響

ジグリコールアミド型の Polymer 修飾大腸菌を用いて、希土類金属とコモンメタル (Cu 及び Al) の吸着率に対する pH の影響を検討した (Fig.2)。その結果、未修飾の大腸菌と比べ、pH 2-3 で著しく希土類金属の吸着率が向上し、ジグリコールアミド酸型配位子を有する抽出剤の希土類抽出挙動と類似する吸着挙動が観察された。本研究で調製したバイオ吸着剤を用いることで、コモンメタ

ルからの希土類金属の分離がより高効率になることが示唆された。

この得られた吸着特性は、DODGAA を用いた場合の希土類金属の抽出傾向、および既報の化学修飾大腸菌の希土類金属の吸着傾向と類似している。一方、polymer 1 を修飾した大腸菌に対するコモンメタルの吸着特性は、未修飾の大腸菌とほとんど差がみられなかった。さらに、既報の化学修飾大腸菌と比べると、pH 2-3 における、polymer 1 修飾大腸菌に対するコモンメタルの吸着率は、およそ半分程度に減少していることがわかった。これは、本研究で提案したポリマーを用いる化学修飾法は、従来の方法と比べて、大腸菌細胞にとって温和であり、細胞の変性を低減できたため、コモンメタルと親和性のあるリン酸基やカルボキシル基の固液界面での見かけの濃度上昇を防ぐことができたためであると推察される。

さらに、未修飾の大腸菌、および、化学修飾後の大腸菌を  $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$  の範囲で、FT-IR により分析して、polymer 1 の大腸菌に対する修飾を確認した。その結果、 $4000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$  では2つのサンプル間でスペクトルに大きな差は観察されず、 $3700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  と  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  に N-H、O-H および C-H の伸縮振動のピークが現れた。  $2000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$  で観察されたピークについては、以下のように同定した。

アミド吸収帯 I および II のピークが  $1655\text{ cm}^{-1}$  および  $1550\text{ cm}^{-1}$  付近に現れた。前節と同様に、 $1460\text{ cm}^{-1}$ 、 $1400\text{ cm}^{-1}$  付近にカルボキシル基の O-H 結合の変角振動とカルボキシアニオン由来のピークがそれぞれ観察された。さらに、リン酸エステルとリン酸基由来のピークが  $1240\text{ cm}^{-1}$  および  $1075\text{ cm}^{-1}$  付近に確認された。さらに、polymer 1 を化学修飾したサンプルにおいて、 $1140\text{ cm}^{-1}$  にエーテル結合由来のピークが現れた。ジグリコールアミド酸型配位子は、エーテル結合を有する。したがって、このピークは、大腸菌に修飾されたジグリコールアミド酸型配位子の構造に含まれるエーテル結合由来であると考えられる。以上より、大腸菌に対する polymer 1 の修飾が示唆された。

また、 $\text{Dy}^{3+}$  の吸着率の経時変化を検討した結果、polymer 1 修飾大腸菌に対する希土類金属の吸着反応は迅速であり、5 分以内でほぼ定量的に吸着されることがわかった。吸着が細胞内部で進行した場合、吸着反応は長時間を要する傾向がある。吸着反応が大腸菌表面で生じることおよび、吸着剤が粉末状であるためその表面積が大きいこと、短時間で吸着反応が平衡に達したと考えられる。

次に、脱着実験の結果を Fig. 3 に示す。その結果、 $1\text{ M HNO}_3$  により、大腸菌に吸着した  $\text{Dy}^{3+}$  をほぼ定量的に脱着可能であることがわかった。さらに、吸着と脱着の操作を3回繰り返しても、本研究で調製したバイオ吸着剤の性能はほぼ変化しなかった。したがっ

て、本手法による化学修飾は、高効率な希土類金属の分離を達成し、繰り返し利用可能なバイオ吸着剤の開発に対して有効な方法であると期待できる。

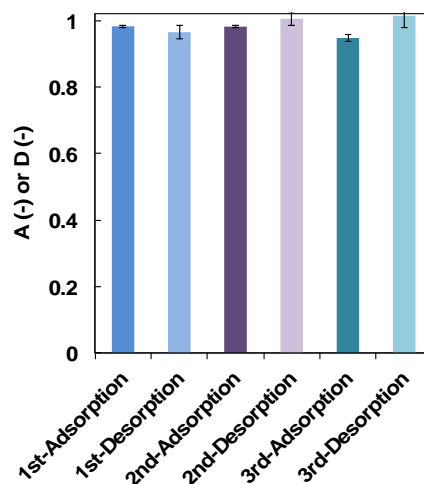


Fig. 3 吸着・脱着の繰り返し実験 (吸着実験条件：温度： $30^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}_{\text{eq}}=3$ 、 $C_i=30\text{ ppm}$ ；脱着実験には  $1\text{ M HNO}_3$  を使用)

希土類金属の大腸菌への吸着反応を Langmuir 型の吸着だと仮定した場合の  $\text{Lu}^{3+}$  の吸着等温線を Langmuir の吸着等温式を Eq. (3) で解析した。

$$Q_{\text{eq}} = Q_{\text{max}} K_{\text{ad}} C_e / (1 + K_{\text{ad}} C_e) \dots \text{Eq. (3)}$$

ただし、 $Q_{\text{eq}}$ ：吸着量( $\text{mg/g}$ )、 $Q_{\text{max}}$ ：飽和吸着量( $\text{mg/g}$ )、 $K_{\text{ad}}$ ：吸着平衡定数( $\text{L/mg}$ )をそれぞれ示す。この結果から、化学修飾により  $\text{Lu}^{3+}$  の  $Q_{\text{max}}$  は、 $42.7\text{ mg/g}$  から  $70.5\text{ mg/g}$  へ向上することが明らかとなった。

Polymer 1 修飾大腸菌を用いた希土類金属の吸着実験結果を Langmuir および Freundlich の吸着等温式で整理することで、吸着等温線を求めた。さらに、これらの吸着等温式に対する  $R^2$  値、各パラメーターを算出した。polymer 1 修飾大腸菌に対する希土類金属の吸着現象は、Freundlich 型の吸着様式により当てはまることがわかった。これより、polymer 1 は大腸菌表層に均一に単層として存在するのではなく、重層、かつ、密度も不均一な状態で大腸菌表層に修飾されたことが示唆された。さらに、polymer 1 修飾大腸菌に対する希土類金属の吸着反応が Langmuir 型であると仮定した場合、希土類金属の飽和吸着量は、未処理の大腸菌と比べ最大で 2.4 倍増加することがわかった。

さらに、polymer 1 修飾大腸菌は、希土類金属の吸着・脱着実験を3回繰り返してもほぼ吸着と脱着傾向が変化しなかった。したがって、細胞表層の化学修飾は、高効率な希土類金属の分離を達成し、繰り返し利用可能なバイオ吸着剤の開発に対して有効な方法であると期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. 後藤雅宏、吉田航, レアメタルの高度分離技術 化学工業、第 68 巻、第 5 号、346-351 (2017).

2. W. Yoshida, Y. Baba, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto, 'Extraction and stripping behavior of platinum group metals using an amic-acid-type extractant', J. Chem. Eng. Jpn., 50, 521-526 (2017). 査読有

3. Y. Hosomomi, T. Niide, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, "Biocatalytic Formation of Gold Nanoparticles Decorated with Functional Proteins inside Recombinant *Escherichia coli* Cells", *Anal. Sci.*, **32**, 295-300 (2016). 査読有

4. Y. Hosomomi, R. Wakabayashi, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto, "Diglycolic amic acid-modified *E. coli* as a biosorbent for the recovery of rare earth elements" *Biochem. Eng. J.*, 113,102-106 (2016). 査読有

5. Y. Baba, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto, 'Mutual separation of Indium, Gallium, and Zinc with the amic acid-type extractant D2EHAG containing glycine and amide moieties', *Solvent Extraction Research and Development, Japan*, 23, 9-18 (2016). 査読有

6. 後藤雅宏, 生物機能ならびに生物材料を利用した高性能イオン交換材料の開発, 日本イオン交換学会誌、第 27 巻、第 3 号、33-41(2016).

7. Y. Baba, F. Kubota, M. Goto, R. W. Cattrall, S. D. Kolev, 'Separation of cobalt (II) from manganese (II) using a polymer inclusion membrane with N□[N, N□di (2□ethylhexyl) aminocarbonylmethyl] glycine (D2EHAG) as the extractant/carrier', J. Chem. Technol Biotechnol., 91, 1320-1326 (2016). 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 後藤雅宏、細縦侑貴穂, 細胞表層の界面修飾によるレアメタル分離剤の開発, 第 33 回日本イオン交換研究発表会 (2017)

2. 細縦侑貴穂、久保田富生子、神谷典穂、後藤雅宏, “大腸菌を利用した希土類金属の回収”, 化学工学会年会第 82 回年会 (2017)

3. 後藤雅宏, 資源循環型社会を構築するためのレアメタルの分離技術, 日本学術会議公開シンポジウム(2017)

4. 後藤雅宏, 日本発のレアメタル分離用の抽出剤開発, 分離技術会年会 (2017)

5. 後藤雅宏、吉田航、久保田富生子 海底資源からの溶媒抽出法によるレアメタル回収, 日本海水学会第 68 年会、(2017)

6. 吉田航、馬場雄三、久保田富生子、Kolev S. D、後藤雅宏, 高分子包接膜を用いたレアメタルイオンの膜透過と膜安定性の向上、化学工学会東京大会(2017)

7. W. Yoshida, Y. Baba, F. Kubota, S.D. Kolev, M. Goto, Selective membrane transport of rare earth ions by a polymer inclusion membrane The 17th Congress of the Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering, (2017)

8. Y. Hosomomi, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto, "Modification of *E. coli* for the development of a biosorbent of rare earth elements", Rare Earths 2016 in Sapporo, JAPAN, (2016)

9. 細縦侑貴穂、久保田富生子、若林里衣、神谷典穂、後藤雅宏, “金属イオン回収に向けた大腸菌の表層設計法の開発”, 化学工学会第 48 回秋季大会 (2016)

10. Y. Hosomomi, F. Kubota, R. Wakabayashi, N. Kamiya, M. Goto, "The design of the cell surface of *E. coli* to recovery metal ions", 25th Int. Symp. Chem. Eng., (2016)

〔図書〕(計 1 件)

1. F. Kubota, J. Yang, M. Goto, 'Ionic liquid-based extraction and the application to liquid membrane separation of rare earth metals', Application of Ionic Liquids on Rare Earth Green Separation and Utilization, Chapter 4, pp.73-83, Springer (2016)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学 後藤研究室

<http://www.bioeng.cstm.kyushu-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 雅宏 (GOTO MASAHIRO)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：10211921

(2)研究協力者

久保田 富生子 (KUBOTA FUKIKO)

九州大学・工学研究院・助教