

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630394

研究課題名(和文)細胞表層設計に基づいた希土類金属の高度分離のための新規吸着剤の開発

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

研究代表者

後藤 雅宏(Goto, Masahiro)

九州大学・工学(系)研究科(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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 先端材料に不可欠な希土類金属は安定な供給が難しいため、高効率な分離回収法の確立が急務とされている。近年では、環境負荷が小さい微生物を、金属イオンの吸着剤として用いる生物学的分離法が注目されている。我々はこれまでに、大腸菌が希土類金属を吸着することを報告したが、そのままの大腸菌では、吸着剤としての性能が乏しかった。そこで、大腸菌の表層に、希土類親和性の高いジグリコールアミド酸骨格を導入し、希土類金属へ高い選択性と吸着能を付与することを試みた。その結果、希土類金属の分離性能が大幅に向上し、吸着能力も2倍以上に向上した。大腸菌の表層改変が、高効率のバイオ吸着材の開発に、有効性であることを検証した。

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：吸着分離 希土類分離 レアメタル リサイクル バイオソープション イオン交換 吸着剤 生物吸着

1. 研究開始当初の背景

希土類金属 (レアアース) とは、ランタノイド系 15 元素にスカンジウム (Sc)、イットリウム (Y) を加えた 17 種類の金属元素の総称である。それらは独特の性質を有しているため、最先端機器の中核を担う部品の材料の一部であり、日本の産業にとって欠かせない存在である。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希土類金属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希土類金属の吸着剤として選択した。

2. 研究の目的

先端材料に不可欠な希土類金属は、安定な供給が困難であるため、高効率な分離回収法の確立が急務とされている。従来法 (溶媒抽出法等) は高効率である一方、有機溶媒を用いるため環境負荷が大きい。そこで、微生物を金属の吸着剤として用いる生物学的方法が新たに注目されている。また、大腸菌が希土類金属を吸着することが報告された。しかし、そのままの大腸菌では、吸着剤としての性能が細胞膜の組成に大きく依存する。近年、溶媒抽出においてジグリコールアミド酸骨格を持つ抽出剤 (DODGAA 等) が希土類金属へ高い選択性を示すことが報告された。そこで、この骨格を大腸菌に修飾し、その吸着剤としての能力を改善することを本研究の目的とした。

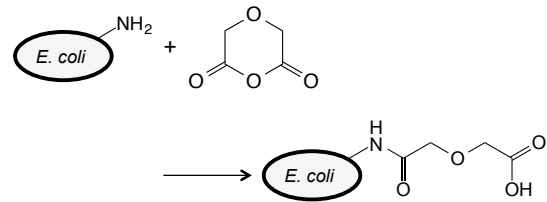
3. 研究の方法

「実験操作」

3-1. 大腸菌の化学修飾

大腸菌 (菌株 BL21) を培養後、一晩凍結乾燥したものに対して化学修飾を行った。その反応を **Scheme 1** に示す。大腸菌を 100 mM 炭酸バッファー (pH 9.0) に添加し、任意の量の無水ジグリコール酸を加え、室温で 60 分間反応させた。得られた生成物の遠心分離を

し、100 mM 酢酸バッファー (pH 4) で 3 回洗浄することにより反応を停止させた。その後、生成物を一晩凍結乾燥することによって吸着剤を得た。



Scheme 1 大腸菌の化学修飾

3-2. 化学修飾大腸菌の FT-IR による分析

未修飾大腸菌、炭酸バッファーに浸しただけの大腸菌および修飾後の大腸菌を 4000–700 cm^{-1} の範囲で FT-IR により分析を行い、大腸菌への化学修飾を確認した。

3-3. 希土類金属の吸着分離実験

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。0.1 M HNO_3 または 1 M 及び 10 M NaOH により水相の初期 pH を調製した。PP 製遠沈管に原料水相 2.5 mL と凍結乾燥した大腸菌 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。

吸着率 (A) と吸着量 (Q : mg/g) の定義式をそれぞれ **Eq. (1)**、**(2)** に示す。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

大腸菌の細胞膜には、脂質二重膜やタンパク質由来のリン酸基やカルボキシル基が存在する。これまでに我々は、希土類金属はこれらの官能基に吸着され、大腸菌が希土類金属の新規吸着剤となり得ることを示した。しかし、大腸菌を吸着剤として用いた場合、吸着特性がその細胞膜の組成に大きく依存するため、金属間によっては分離効率が低くなることが懸念される。

近年、溶媒抽出においてジグリコールアミド酸骨格を持つ N,N -dioctyldiglycol amic acid (DODGAA) が希土類金属へ高い選択性を示すことが報告された (**Scheme 1**)。DODGAA の希土類金属に対する選択性は、ジグリコールアミド酸骨格から生じる静電相互作用、硬

い酸・塩基相互作用さらにサイズ認識効果によって生じると報告されている。そこで、本研究では、このジグリコールアミド酸型配位子を大腸菌表層へ導入することで、希土類金属に対して高い選択性を有するバイオ吸着剤の開発を行った。

4-1. 大腸菌の化学修飾の確認

未修飾大腸菌、炭酸バッファーに浸しただけの大腸菌および修飾後の大腸菌を 4000–700 cm^{-1} の範囲で FT-IR により分析を行い、大腸菌への化学修飾を確認した。3500–3000 cm^{-1} に N-H、3000–2850 cm^{-1} に C-H 伸縮運動、1600–1500 cm^{-1} にアミド I および II 吸収帯がすべてのサンプルにおいて観察された。また、1500 cm^{-1} 以下の指紋領域において、1400 cm^{-1} 付近にカルボン酸、1230 cm^{-1} および 1070 cm^{-1} 付近にリン酸エステル由来のピークも同様に観察された。化学修飾後のサンプルにおいてのみ、1135 cm^{-1} 付近にエーテル結合のピークが現れた。これは、今回導入したジグリコールアミド酸型の官能基由来のものであると同定できる。この結果より、大腸菌の化学修飾の成功が示唆された。

4-2. 吸着実験

希土類金属 (ネオジム、ジスプロシウム、ルテチウム) の初期濃度を 5 ppm に調製し、化学修飾大腸菌および未修飾大腸菌を用いて各 pH 吸着実験を行った (Fig. 1 (a), (b))。その結果、化学修飾大腸菌を用いた場合、未修飾大腸菌と比べ、pH 2~3 での吸着率が著しく増加することが分かった。今回導入した DODGAA は pH 2~3 で希土類金属を抽出することが知られている。したがって、大腸菌にジグリコールアミド酸骨格が修飾されたため、低 pH 域での希土類金属の吸着率が、大幅に増加したものと考えられる。

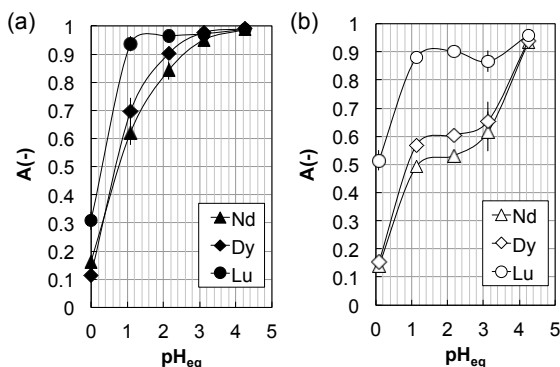


Fig. 1 吸着実験結果: 使用した吸着剤 (a) 化学修飾大腸菌, (b) 未修飾大腸菌

この実験結果から、化学修飾大腸菌を用いると希土類金属の吸着率は pH 2 で 90 %以上で達することが確認された。また、吸着剤の選択性を比較するため、希土類金属の吸着率が 0.5 となる pH (半値 pH: $\text{pH}_{1/2}$) および Nd と Al、Nd と Cu におけるその差 ($\Delta \text{pH}_{1/2}$) を求めた。 $\Delta \text{pH}_{1/2}$ は吸着剤や抽出剤の分離能力を評価に用いられる。その結果、化学修飾した大腸菌を用いた場合、希土類金属の $\text{pH}_{1/2}$ が低 pH 側へシフトし、 $\Delta \text{pH}_{1/2}$ の値が増加することがわかった。したがって、化学修飾により大腸菌の希土類金属吸着剤としての分離性能が大きく向上することが示された。

4-3. バイオ吸着剤の吸着能力

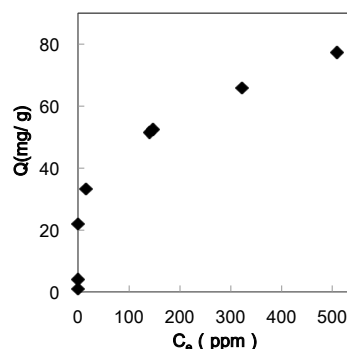


Fig. 2 Dy の吸着量 (初期 pH 3)

化学修飾大腸菌のジスプロシウム吸着量を確認するため、ジスプロシウム初期濃度を変化させ、吸着実験を行った。その結果を Fig. 2 に示す。未修飾大腸菌の吸着反応を Langmuir 型の吸着で仮定した場合、飽和吸着量 Q_{max} は 32.7 mg/g であった。一方、今回大腸菌の表層を化学修飾した場合、吸着量は指数関数的に増加し 80 mg/g 付近で平衡状態に達した。以上の結果より、大腸菌を化学修飾することでジスプロシウムの吸着量が約 2.5 倍以上に増加することが明らかとなった。

成果のまとめ

希土類金属に対して高い選択性を示すジグリコールアミド酸型抽出剤 *N,N*-dioctyl diglycol amic acid (DODGAA) の配位子に類似した官能基を大腸菌の外膜に化学修飾することにより、大腸菌の希土類金属吸着能力を向上させることに成功した。化学修飾には無水ジグリコール酸を用いたアミノ基のスクシニル化反応を利用し、FT-IR で大腸菌へ配位子が修飾されたことを確認した。さらに、大腸菌の表層改変により、大腸菌の希土類金属への選択性および吸着容量が大きく向上することが明らかとなった。したがって、化学修飾による表層改変は、大腸菌の希土類金属吸着剤としての性能を大幅に改善することに対し有効であることが実証された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 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.*, accepted (2016). 査読有

2. 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).

3. 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

4. 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(2015). 査読有

5. Y. Baba, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto, 'Development of novel extractants with amino acid structure for efficient separation of nickel and cobalt from manganese ions', *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53, 112-118, (2014). 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Y. Hosomomi, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto, "Biosorption of rare earth elements by chemically modified *E. coli* ", The 21st Symposium of Young Asian Biochemical Engineer's Community East Asia: Rejuvenating Biotechnology, (2015)

2. Y. Hosomomi, F. Kubota, R. Wakabayashi, N. Kamiya, M. Goto, "Modification of *E. coli* cell surface for preparing a metal ion adsorbent ", 2015 Taiwan/Korea/Japan Joint Meeting on Chemical Engineering, (2015)

3. Y. Hosomomi, F. Kubota, R. Wakabayashi, N. Kamiya, M. Goto, "Chemical modification of *E. coli* and its application to the biosorption of metal ions ", The 27th International Symposium on Chemical Engineering, (2015)

4. 細縦侑貴穂, 後藤雅宏, "大腸菌を用いた機能性タンパク質修飾金ナノ粒子の新規調製法の開発", 化学工学会九州支部大会, (2015)

5. 細縦侑貴穂, 若林里衣, 久保田富生子, 神谷典穂, 後藤雅宏, "金属イオン吸着分離のための大腸菌表面の修飾", 第 31 回日本イオン交換研究発表会, (2015)

6. 細縦侑貴穂, 二井手哲平, 久保田富生子, 後藤雅宏, 神谷典穂, 大腸菌内での金ナノ粒子の合成とその表面修飾による高機能化, 化学工学会第 80 年会, (2015)

7. 細縦侑貴穂, 後藤雅宏, バイオマテリアルを用いた金属イオンの固定化, 第 25 回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会 (2014)

8. 細縦侑貴穂, 久保田富生子, 神谷典穂, 後藤雅宏, 遺伝子工学的手法を用いた大腸菌表面設計による希土類金属の新規バイオ吸着剤の開発, 化学工学会第 46 回秋季大会 (2014)

9. Y. Hosomomi, R. Wakabayashi, F. Kubota, N. Kamiya, M. Goto, "Sorption properties of rare earth elements on chemically modified *E. coli*, 6th Int. Conf. Ion Exch., 2014 (ICIE 2014)

10. Y. Hosomomi, T. Niide, R. Wakabayashi, F. Kubota, M. Goto, N. Kamiya, Enzyme-catalyzed formation of gold nanoparticle by *Escherichia coli*, The 27th International Symposium on Chemical Engineering, (2014)

[図書] (計 1 件)

2. 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) 研究分担者

久保田 富生子 (KUBOTA FUKIKO)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：60294899