

Synechococcus sp.を用いた光合成微生物電池

(第1報 電池出力に及ぼす照射光の波長, アノード溶液のpHおよび
Synechococcus 内のグリコーゲン量の影響)

BIOFUEL CELLS CONTAINING PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS

Synechococcus sp.

Part 1. Effects of wavelength of incident light, pH of anode solution and glycogen content
of *Synechococcus* on the performance of the biofuel cells)

柳 下 立 夫*¹

Tatsuo YAGISHITA

堀 米 孝*¹

Takashi HORIGOME

田 中 和 子*²

Kazuko TANAKA

Abstract

The biofuel cell containing photosynthetic microorganisms, *Synechococcus* sp. (UTEX2380), and an electron transfer mediator, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, has been examined at various conditions to clarify the relation between the biological activities of the microorganisms and the performance of the fuel cell. The generation of the current from the fuel cell under light was ascribed to the activity of photosystem II of the microorganisms, which was estimated from the action spectrum of the current generation from the fuel cell. The pH of the anode solution gave little effect on the current output of the fuel cell under light, while the current output in the dark decreased significantly at pH lower than 6. The decreases of endogenous glycogen content that made shorten the life of the microorganisms, that is, the life of the fuel cell, was more significant when the fuel cell was run under light, indicating energy source is required to maintain not only the respiratory but also the photosynthetic activity of the microorganisms. Therefore, the maintenance of the endogenous glycogen content to the certain level while the fuel cells are run is important to elongate the life of the fuel cell.

Key words: Biofuel cells, Mediator, Cyanobacterium, (*Synechococcus* sp.)

1. 緒言

太陽エネルギーの利用は環境問題や化石資源の枯渇問題を解決する有効な方法である。現在、太陽エネルギーを利用したものとして太陽電池や太陽熱集熱器等があるが、著者らは植物などの光合成系で行われている効率の良い太陽エネルギー変換プロセスに注目して、光合成を利用した新しい太陽エネルギー変換デバイスの研究を行っている。

今までに植物や光合成細菌などの光合成系等を用いた太陽エネルギー変換デバイスや人工光合成システム

が検討されているが^{(1),(2)}, いずれもわずかに電流が観測されたという段階にある。著者らは生きている光合成微生物と酸化還元物質 (mediator) を組み合わせた光合成微生物電池について検討してきた^{(3),(5)}。

Anabaena variabilis M-2 や *Synechococcus* sp.

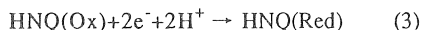
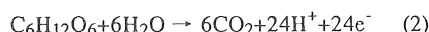
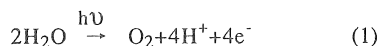
(UTEX2380) などの光合成微生物, そして 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ) を mediator として組み合わせたアノード溶液の電池では数日間一定の出力電流を維持し, 光があたっているときだけでなく, 光を遮断したときにも電流が観測された。前報までの結果から, これらの電池から得られた出力電流は光照射下では微生物の光合成による水の光分解から発生した電子 (式 (1)), そして光遮断下では光合成によって微生物内に蓄えられた炭水化物 (主にグリコーゲン) などが代謝されたとき発生した電子 (式 (2))

原稿受付 平成5年4月21日

*1 東京農工大学工学部 (〒184小金井市中町2-24-16)

*2 理化学研究所 (〒351-01和光市広沢2-1)

がHNQに渡されて(式(3)), 電極まで運ばれた結果ではないかと推測している⁽⁵⁾。



本報では, *Synechococcus* sp. (UTEX2380) とHNQの組み合わせを用いた電池において, 光照射下における電池内の電子の流れを調べる目的で出力電流に対する照射光の波長依存性を測定した。さらに, 微生物の生理活性に大きく関係すると考えられるアノード溶液のpHおよび生体内貯蔵エネルギー源(グリコーゲン)の減少量と電池から得られた電気量を比較し, 出力電圧の低下の原因について検討した。

2. 実験

2-1. *Synechococcus* の培養

Synechococcus sp. の培養, 集菌方法, そしてクロロフィル定量はすでに報告した方法と同様である⁽⁵⁾。*Synechococcus* をASN-III培地(pH 8.0)中で一週間培養した後, 遠心(4000×g)によって集菌して25 g/ml NaClを含む50 mMリン酸緩衝液(特に断らないかぎりpH 8.0)中に懸濁させた。

2-2. 電池の構成

電池セルの構造および電池の操作方法是すでに報告した方法に従った⁽⁵⁾。アノード溶液は12 μg Chl./ml *Synechococcus* (乾燥重量にして約50 mg), 0.25 mM HNQ, 25 g/ml NaClを含んだ50 mMリン酸緩衝液(特に断らないかぎりpH 8.0)40 mlである。カソード溶液は0.1 M フェリシアン化カリウムと25 g/ml NaClを含んだリン酸緩衝液40 mlである。電極にはカーボン繊維(4×4 cm²)を用いた。電池を構成した後, 25℃, 光照射下または光遮断下の条件下でアノード溶液を3%(v/v)CO₂ガスを含んだN₂ガスで攪拌しながら開放電圧を測定し, 一定値(0.8 V)に達した後負荷抵抗をかけた。

2-3. *Synechococcus* 内のグリコーゲン量の測定

Synechococcus 内のグリコーゲン量の定量はDuboisの方法で行なった⁽⁶⁾。60%(w/v)のKOH溶液3 mlを3 ml *Synechococcus* 懸濁液に加えて混合し, 20分間煮沸してその後室温まで冷却した。この溶液に7.5 mlのエタノール(99.5%)を加えて再び10~20分間煮沸し, 室温まで冷却した。この溶液を15分間遠

心(3000×g)して上澄みを除去した後, 沈殿しているグリコーゲンの加水分解物(グルコース)に5 mlの蒸留水を加えた。この溶液2 mlと50 μlの80%(w/v)フェノール, 5 mlの硫酸(95%)を加えて10分間放置した後, 25℃で1時間攪拌した。その後, この溶液の485 nmの吸収を測定し, 既知の量のグルコースを用いて得た検量線をもとにグルコース量を求めた。グリコーゲン量の値はグルコース量の値の0.9倍である。

3. 結果および考察

3-1. 光合成微生物電池の電圧-時間曲線

図1に*Synechococcus*とHNQの組み合わせを用いた光合成微生物電池の電圧-時間特性の一例を示す。負荷抵抗500 Ωをかけるといずれの条件下でも電圧は低下し, その後光照射下では0.5 V, そして暗所では0.1 V付近の電圧を維持した。このように, 光照射下では光遮断下に比べて高い電圧が得られた。しかしながら, 光照射下の場合, 24時間後には電圧は低下し, 36時間後には0 V近くまで落ちてしまった。一方, 光遮断下でも24時間後から電圧は減少する傾向にあった。

3-2. 出力電流に対する照射光の波長依存性

光照射下における電池の出力電流が*Synechococcus*の光合成反応とどのように関係しているかを調べるために, 干渉フィルタ(KL シリーズ, 東芝ガラス)を通して光を照射(27 μE m⁻² s⁻¹)し, 負荷抵抗200 Ω

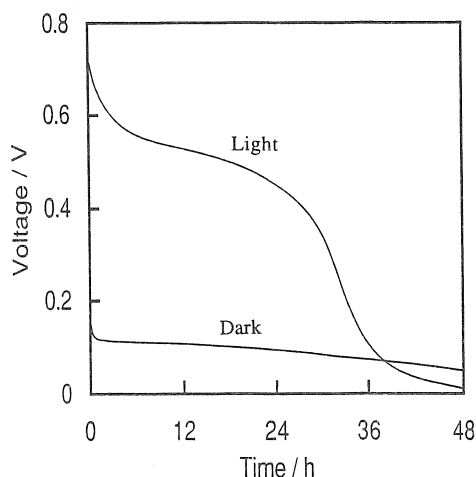


図1 *Synechococcus* sp. とHNQを用いた電池の電圧-時間曲線

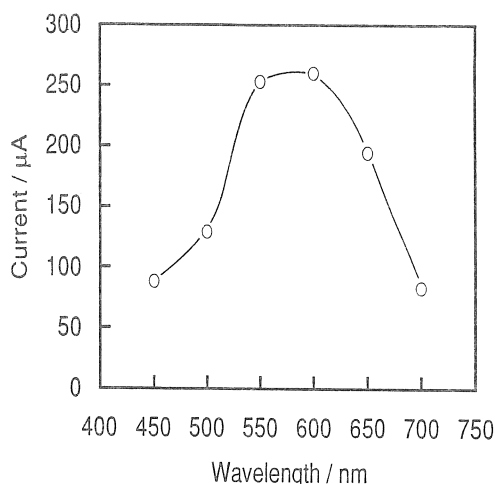


図2 出力電流に対する照射光の波長依存性

のもとで電池を働かせたときの出力電流に対する照射光の波長依存性を測定した。その結果を図2に示す。出力電流の値は負荷抵抗をかけてから電流が安定したとき(約20分後)の値である。照射光の波長を変え、と電流は500 nm から増加し、580 nm 付近で最大となり、より長波長で減少した。この作用スペクトルは光合成色素であるフィコエリトリン(最大吸収波長565 nm)とフィコシアニン(最大吸収波長610 nm)の吸収スペクトルと一致する。これらの色素は主に光エネルギーを光合成系IIに渡すので、光照射下での出力電流の発生に光合成系IIでの反応、すなわち光合成による水の光分解(式(1))が関与していると考えられる。

3-3. 出力電流に対するアノード溶液のpHと *Synechococcus* 内のグリコーゲン量の影響

3-3-1. 光照射下

前報で、電池を光照射下で長時間働かせた後に *Synechococcus* の酸素発生速度を測定したところ、非常に低下していたことを報告した⁽⁵⁾。この酸素発生速度の低下、すなわち光合成による水の光分解の活性の低下が、図1に示されている光照射下で電池を働かせたときの電圧の減少として現われたと考えられる。一般に、生体活性は懸濁溶液のpHに左右される。電池を働かせている条件下では、アノード溶液を攪拌しているCO₂ガスが溶液中に炭酸塩として溶解したり、また式(1)(光遮断下の場合には式(2))によって発生した水素イオンがHNQによって細胞外に運ば

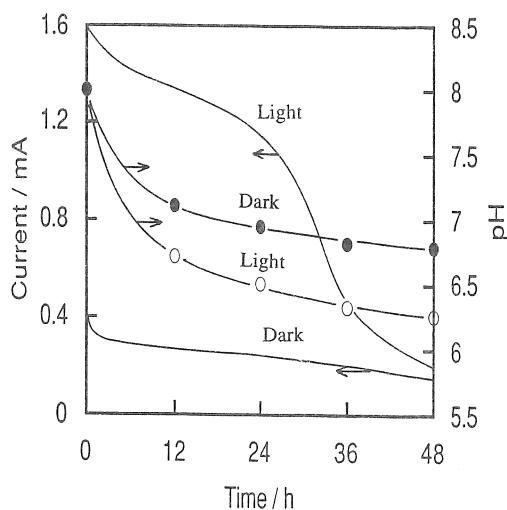


図3 アノード溶液のpHの経時変化

れ、式(4)に示されるように負極において還元型HNQが酸化されたときに水素イオンが放出されるため、アノード溶液のpHは最適値の8.0より低下していた(図3)。

負極: $\text{HNQ(Red)} \rightarrow \text{HNQ(Ox)} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$ (4)
光照射下で電池を働かせた場合24時間後に電流が低下するが、このときのpHは6.5、そして電流が0近くまで落ちてしまったときのpHは6.3であった。そこで種々のpHのリン酸緩衝液を調製し、その緩衝液を用いて電池を構成して働かせたとき、アノード溶液のpHが出力電流にどのように影響を及ぼすかを調べた結果を図4に示す。光照射下ではpHが7.0以下で

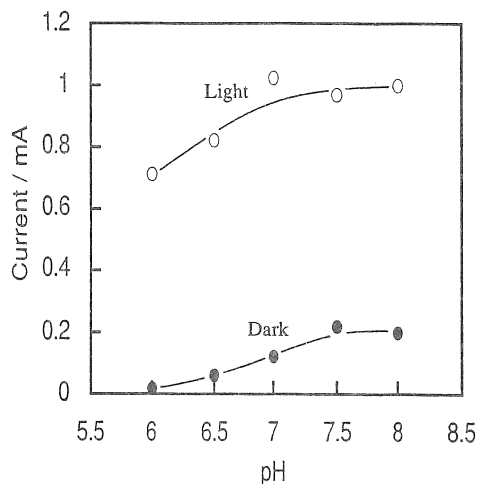


図4 出力電流に対するアノード溶液のpHの影響

は電流は減少するが、pH 6.0 の場合でも pH 8.0 での電流の 70 % 程度を維持した。したがって、アノード溶液の pH が光照射下での電圧の低下の決定的な要因ではないと考えられる。

光合成微生物は光があたっているところでは光エネルギーから直接生体活動に必要なエネルギーを得ている。しかしながら、電池を働かせている条件下では光エネルギーは電気エネルギーとして取り出されてしまう。そのため、*Synechococcus* は光合成によって蓄えられていたグリコーゲンなどの貯蔵エネルギー源から生体活動に必要なエネルギー源を得ていることが考えられる。そして、長時間電池を働かせるとこのエネルギー源が減少し、そのために酸素発生活性が低下したのではないかと考えられる。そこで電池出力に及ぼす *Synechococcus* 内のグリコーゲン量の影響を調べた。12 時間ごとに電池内から *Synechococcus* を取り出してグリコーゲン量を測定した結果を図 5 に示す。光照射下で電池を働かせるに伴い *Synechococcus* 内のグリコーゲン量は減少した。そして 24 時間後にはグリコーゲン量は電池を働かせる前の値の 40 % 以下になり、光遮断下の場合よりも著しく減少した。培養期間が異なる *Synechococcus* (培養期間が長いほど *Synechococcus* 内に蓄えられているグリコーゲン量も大きくなる) をクロロフィル量が一定になるようにアノード溶液中加入したときの *Synechococcus* のグリコーゲン含有量と電池を 48 時間働かせたときに得られた電気量の相関を図 6 に示す。光照射下、光遮断下ともに蓄えられているグリコーゲン量が多い *Synechococcus* を用いた電池で得られた電気量も大きかった。光照射下では *Synechococcus* のグリコーゲン

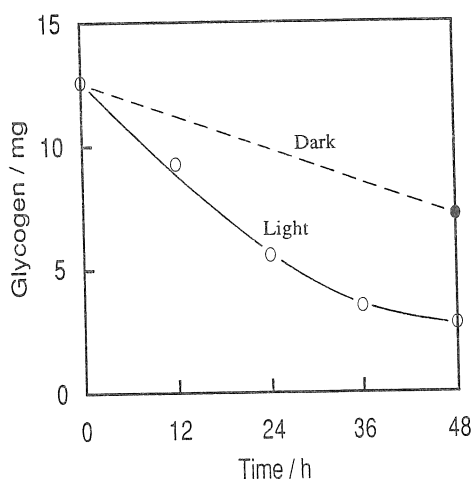


図 5 *Synechococcus* 内のグリコーゲン量の経時変化

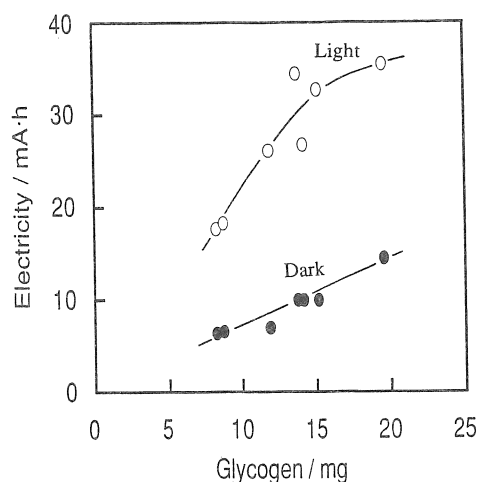


図 6 電池内に入れた *Synechococcus* 内のグリコーゲン量とその電池を 48 時間働かせたときに得られたときに得られた電気量との相関

含有量が 15 mg 以上になると得られた電気量はほとんど変わらなくなった。以上の結果から、光遮断下で電池を働かせた場合と同様に光照射下での電流の発生に *Synechococcus* 内のグリコーゲン量が関与し、長時間働かせるとグリコーゲンが減少するために生体の活性が低下し、それが電圧の低下を引き起こすと考えられる。しかしながら、光合成の初期反応である水の光分解を阻害する carbonyl cyanide - *m* - chlorophenyl - hydrazon をアノード溶液に加えると光照射下での電流はほとんど抑制されることから⁷⁾、光照射下で得られた電流のほとんどは水の分解によって発生した電子に由来し、グリコーゲンの分解によって発生する電子は直接電流として観測されないと考えられる。

3-3-2. 光遮断下

図 6 に示されるように、光遮断下で電池を働かせたとき、電池から得られる電気量は *Synechococcus* 内のグリコーゲン量に依存する。電池を長時間働かせたとき、*Synechococcus* 内のグリコーゲン量が徐々に減少し (図 5)、この減少が電流の減少として現われたと考えられる。しかし、48 時間電池を働かせてもグリコーゲン量の減少量は、HNQ を加えずに電池を働かせる条件下においた場合とほとんど同じであり、HNQ はグリコーゲンの減少に影響を及ぼさなかった⁷⁾。一方、電池を働かせる前は 8.0 であった pH は徐々に低下し、36 時間後には 6.8 になった (図 3)。

また所定の pH に調製した緩衝液で構成された電池では、図4に示されるようにアノード溶液の pH が低下するにつれて出力電流は低下し、pH が 6.0 の場合にはほとんど流れなかった。この結果は、光遮断下でのエネルギー源と考えられるグリコーゲンの分解過程は環境の pH に大きく左右され、pH 6.0 以下では非常に起こりにくくなっていることを示している。

4. まとめ

(1) 光合成微生物電池において、光照射下における電流の発生に光合成系 II の反応が関与していることが照射光の波長依存性の結果から明かとなった。

(2) 光照射下において、出力電流を維持するためにはある程度の量のグリコーゲンが要求される。したがって、グリコーゲン量のある量以上に保つように電池を働かせれば電池の出力を長時間維持することができると思われる。

(3) *Synechococcus* の光合成能は比較的環境の pH の影響を受けないが、グリコーゲンの分解過程は環境の pH に大きく左右される。したがって、光遮断下で電池を働かせる場合 pH のコントロールは重要である。

参考文献

- (1) M. Mimeault and R. Carpentier, Kinetics of photocurrent induction by a thylakoid containing electrochemical cell, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 22 (1989) 145 - 158.
- (2) T. Tamura, A. Sato, S. Ajiki, H. Sugino, M. Hara and J. Miyake, A photocell based on a high concentration of chromatophore, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 26 (1991) 117 - 122.
- (3) K. Tanaka, R. Tamamushi and T. Ogawa, Bioelectrochemical fuel-cells operated by the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 35B (1985) 191 - 197.
- (4) K. Tanaka, N. Kashiwagi and T. Ogawa, Effect of light on the electrical output of bioelectrochemical fuel-cells containing *Anabaena variabilis* M - 2: Mechanism of the post - illumination burst, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 42 (1988) 235 - 240.
- (5) 柳下立夫・堀米 孝・田中和子・小川晃男, 海産性藍藻を用いた光合成微生物電池の発電試験, 太陽エネルギー, 16 - 5 (1990) 17 - 22.
- (6) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith, Cimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 350 - 356.
- (7) T. Yagishita, T. Horigome and K. Tanaka, Effects of light, CO₂ and inhibitors on the current output of biofuel-cells containing the photosynthetic organism *Synechococcus* sp., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 56 (1993) 393 - 399.