

# 電子スピン共鳴装置を用いた光合成微生物から生成されるラジカルに関する研究

東北学院大学 学生会員 ○佐々木智昭 小林寿宏 中田祐  
東北学院大学 学生会員 村上将也  
東北学院大学 フェロー会員 石橋良信  
東北学院大学 正会員 韓 連熙

## 【序論】

近年、環境問題やエネルギー問題の深刻化に伴い、太陽エネルギーの利用が望まれている。そこで我々は、電極を用いて光合成微生物から電子を取り出して発電を行うバイオ発電方式に注目した[1]。この方式は、有機物を栄養源として取り込める光合成微生物を用いれば、下水の処理も可能である。

本研究では、低コストで、短期間に発電量を推測するための実験方法を確立し、さらに迅速に、より数多くの光合成微生物のデータを比較することで、発電に最適な光合成微生物の情報を提供することを目的とした。そこで、光合成反応や呼吸反応時に、 $H^+$ 及び $O_2$ を測定することにより、電子の生成量を推測できることが考えられるため、唯一直接的にラジカルの測定が可能な電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いて光合成微生物から発生されるラジカルの同定やESRスペクトルにより定量について検討を行った。

## 【実験方法】

光合成微生物はフォルミディウム・テヌエ (NIES-512) とアナベナ (NIES-77) を用いた。培養は、プラスチックセルで3mlを各々CT培地、CB培地を用いて培養した。培養日数ごとに、電子スピン共鳴装置 (ESR、日本電子、JES-TE300 (X-band)) を用いて生成されるラジカルの測定を行った。ESRの測定はマイクロ波出力: 10 mW、マイクロ波周波数: 9.437 GHz、磁場と磁場掃引幅:  $335.5 \pm 7.5$  mT、磁場変調: 100 kHz、変調幅: 0.1 mT、時定数: 0.1 sec、感度:  $1 \times 500$ 、掃引時間: 4 min、室温下で行った。ラジカルトラップ剤としてDEPMPO ( $C_9H_{18}NO_4P$ 、濃度: 400 mM) を用いた。また測定開始時間は5分とした。

さらに培養日数ごとに分光光度計 (島津製作所、UV-3101 PC) を用いて吸光度の測定を行った。測定法は多点検量線法で、波長: 660.0 nm、セル数: 1、記録範囲: 0~2.00、スリット幅: 0.3で行った。また光学顕微鏡 (カール ツァイス、Axioskop2) を用いて微生物の藻体数の計測も同時に行った。

## 【結果・考察】

光合成微生物をいれずにCT、CB培地のそれぞれを用い、それぞれの培地にトラップ剤を添加してESRの測定を行った結果、ESRスペクトルの安定性を確認した (data not shown)。このことより、配合されている成分はESRスペクトルに与える影響はないと判断された。

CT培地にフォルミデュウム・テヌエとCB培地にアナベナをいれ培養を行い、ラジカルトラップ剤としてDEPMPOを用いてESRで測定を行った結果、DEPMPO-OOH (酸素ラジカル) とDEPMPO-OH (OHラジカル) が検出された。ここで、検出されたDEPMPO-OOHの酸素ラジカルは光合成反応、呼吸反応時に共通して発生した物質であった。よって、DEPMPO-OOHのピークの長さを比較することで電子生成量を推測できると考えられる。

フォルミディウム・テヌエは培養日数13日目に最も多くDEPMPO-OOHが測定され、その後も、吸光度および個体数は増え続けているが、DEPMPO-OOHが減少している。これにより、培養日数は13日目が最も活性化している時期であり、最も電子生成量が多くなると判断された。

アナベナは培養日数1日目に最も多くDEPMPO-OOHが測定された。また培養日数1~5日目までがDEPMPO-OOHを多く測定することができたので、この時期が最もアナベナが活性化していると判断された。また、図1に

---

キーワード 電子スピン共鳴装置 (ESR) 藻類 アナベナ フォルミデュウム・テヌエ

連絡先 〒985-0873 宮城県多賀城市中央1丁目13-1 東北学院大学工学部 環境建設工学科 TEL022-368-7341

よると、どちらも増殖曲線の上昇部分の変化点で DEPMP0-00H のピークの高さが大きくなる傾向があった。他の光合成微生物にも同じような傾向があれば、最大のピークの高さまで待つことなく、より短時間で効率よく活性化された光合成微生物を測定できる可能性がある。

フォルミディウム・テヌエとアナベナの藻体数をそれぞれ計測し、1 ml 当たり藻体数 1 万個まで希釈し、ESR を用いてそれぞれの測定を行った (図 2)。ESR スペクトルを比較すると、アナベナの方が顕著に DEPMP0-00H が検出された。

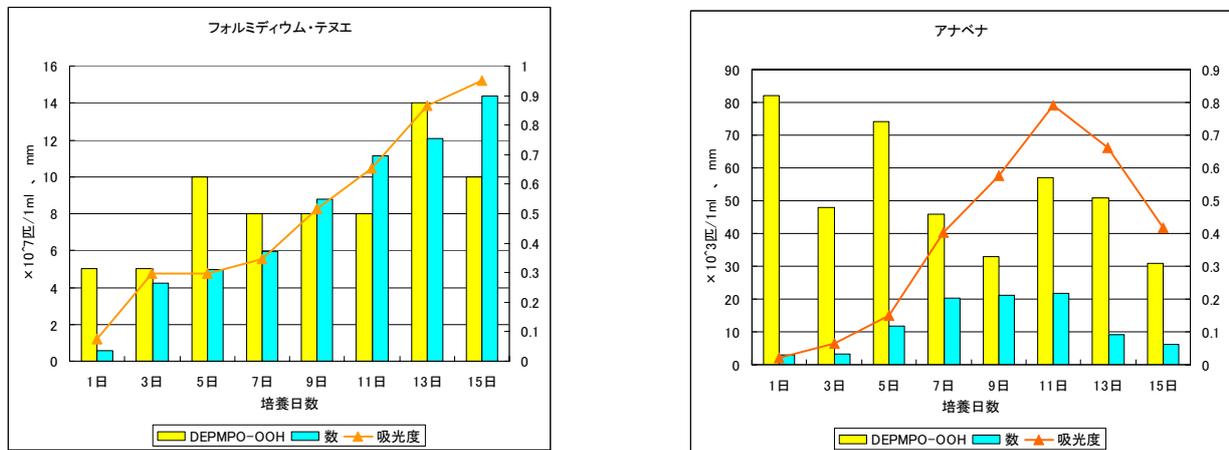


図 1 ESR スペクトルと増殖曲線の関係

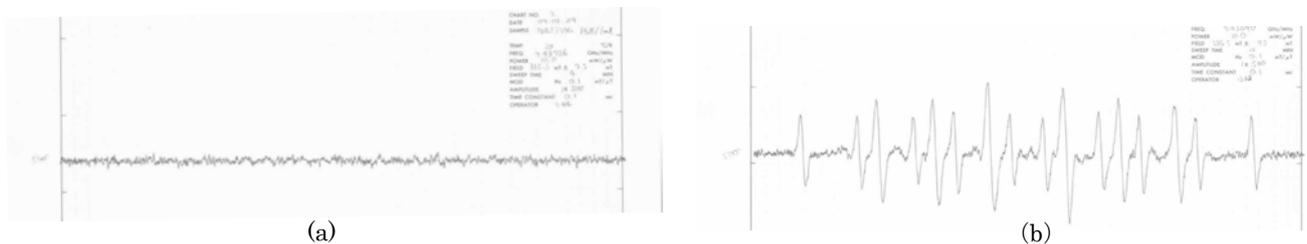


図 2 フォルミディウム・テヌエ (a) 藻体数 1 万個とアナベナ (b) 藻体数 1 万個の ESR スペクトル

**【結論】**

本研究で用いたフォルミデュウム・テヌエとアナベナでは、アナベナがフォルミディウム・テヌエより DEPMP0-00H の長さを全ての条件において上まわっており、アナベナの方が電子を多く生産されることが推測された。このことは柳下ら[1]の研究報告と一致する結果であった。この結果により、現段階における発電に適した光合成微生物はアナベナであることが示唆された。

今回の研究においては、短期間に発電量を推測するための実験方法を確立し、フォルミディウム・テヌエとアナベナの 2 種類のデータを比較できた。さらに、今後、正確な定量を行うことで明確な電子生成量の数値が算出できると思われる。

また、この他の数多くの光合成微生物を、さらに比較、検討していくことで、より発電に最適な光合成微生物を発見することができると思われる。

**【参考文献】**

[1] 柳下立夫 微細藻類を利用した太陽エネルギー（光合成産物）変換技術 資源環境技術総合研究所