

バイオリアクターを用いた酵素実験

高 桑 純

パン用ドライイーストをアルギン酸ナトリウムで包括固定化してバイオリアクターを作り、メチレンブルーの色の变化によって、デヒドロゲナーゼの作用を調べる方法について述べる。さらに、同じバイオリアクターを用い、TTCの色の变化によってデヒドロゲナーゼの活性を調べるとともに、好気呼吸と嫌気呼吸を視覚的に調べる方法についても報告する。酵素実験にバイオリアクターを用いることによって、煩雑な酵素液の準備にかかる労力を減らし、複数の学級で効率的に酵素実験を行うことができる。

【キーワード】 高等学校理科 バイオリアクター デヒドロゲナーゼ メチレンブルー TTC

I はじめに

高等学校生物 I Bにおける「代謝」においては、酵素作用の様々な性質を取り上げている。ここで教材として使われる代表的な酵素にデヒドロゲナーゼがある。しかし、酵素を使った実験では、多くの場合酵素液を作るまでに多くの時間と操作を必要とする。また、デヒドロゲナーゼの実験では、ツンベルグ管を用いた嫌気的環境下におけるメチレンブルーの還元によって酵素活性を視覚的に調べる方法が一般的であるが、ツンベルグ管を吸引するなど煩雑な操作が多く容易にできる実験ではなかった。

ここでは、酵素液の代わりに固定化酵母のバイオリアクターを用いることで、複数のクラスにわたる実験でも酵素を繰り返し使用できるような工夫をするとともに、ツンベルグ管を用いずに1時間の授業の中で簡単に実施できるデヒドロゲナーゼの実験法を紹介する。

II 材料

パン用ドライイースト、アルギン酸ナトリウム、1.5%CaCl₂、0.1%メチレンブルー（以下Mbと表す）、0.02mol/l TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride)、8%コハク酸ナトリウム溶液、チャック付きポリ袋（40mm×50mm）、ガラス棒、ビーカー（100ml 2個、300ml以上1個）、注射器（50ml）、駒込ピペット、ガーゼ、

ろ紙、バーナー、三脚、金網

III 方法

1. バイオリアクターの作成

(1) 以下のようにしてA、B液を作る。

A液：100mlビーカーにパン用ドライイースト2.5gを入れ、水20mlを加えて十分混ぜ合わせる。

B液：100mlビーカーにアルギン酸ナトリウム0.5gを入れ、水20mlを加え十分混ぜ合わせる。この時、水は十分あたたためておいたものを用い（熱湯がよい）、ビーカーを湯煎しながらアルギン酸ナトリウムを完全に溶かす。

(2) A液をB液のビーカーに入れ、十分に混ぜ合わせる。

(3) (2)の混合液を注射器に入れ、200mlほどの1.5%CaCl₂溶液の中に一滴ずつ滴下していく。

(4) (2)の混合液をすべて滴下したら、ガーゼでビーカーの口をおおい3回ほど水洗いする。

2. 温度の違いによる酵素活性の比較

(1) 1で作成したバイオリアクターにMb 3～4滴をかけて混ぜ合わせ、染色する。

(2) 3つのチャック付きポリ袋にろ紙で水気を切ったバイオリアクターを3gずつ入れる。

(3) 各チャック付きポリ袋に、以下に示したような液を5mlずつ入れ、中の空気を追い出し

て口を閉める。

- (4) 各チャック付きポリ袋を以下に示したような温度のお湯につけ、Mbの色の変化を比べる。

〈加えた液体〉	〈温度〉
a 8%コハク酸ナトリウム溶液	30℃
b 8%コハク酸ナトリウム溶液	60℃
c 水	30℃

3. 基質の違いによる呼吸の比較

- (1) 4つのチャック付きポリ袋にろ紙で水気を切ったバイオリアクターを3gずつ入れる。
 (2) 各チャック付きポリ袋に、以下に示したような液5mlと0.02mol/l TTC 1mlを加え、中の空気を追い出して口を閉める。

〈加えた液体〉
d 8%コハク酸ナトリウム溶液
e 0.3molグルコース溶液
f 水

- (3) 各チャック付きポリ袋を30℃のお湯につけ、TTCの色の変化を比べる。

IV 結果と考察

- (1) a～cの20分後の状態を図1に示した。一

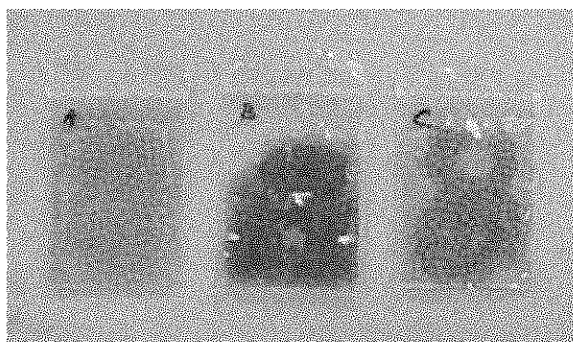


図1 20分後のバイオリアクター

番左がコハク酸デヒドロゲナーゼの基質となる8%コハク酸ナトリウム溶液を入れ30℃においたものである。デヒドロゲナーゼによってMbが還元され、最も色が薄くなっている。中央が60℃においたもので、高温のためデヒドロゲナーゼの活性が抑えられてほとんど変色せず青みを帯びている。一番右が基質の8%コハク酸ナトリウム溶液を加えていないものであるが、色はやや薄くなっている。これ

はドライイーストに含まれている糖分が基質として使われたためと思われる。以上のように、色の変化の比較によって、デヒドロゲナーゼの酵素活性に対する温度の影響を手軽に確認することができる。

- (2) d～fのバイオリアクターの色を15分後に調べると、dが最も赤く変化しており、eとfはかすかに赤みを帯びただけであった。この結果、dでは好気呼吸によるクエン酸回路の活性が確認できる。一方、eではグルコースを基質として若干の好気呼吸は行われたものの、この実験は嫌気的環境で行われているため、大部分はアルコール発酵で消費され、TTCの変色がほとんどおこらなかったと思われる。eでは、実験終了後アルコール発酵による二酸化炭素の発生が確認できた。またfでは、ドライイーストにあらかじめ含まれていた糖分を用いて、若干の好気呼吸が行われたものと思われる。
 (3) どちらの実験でも、バイオリアクターまで作っておけば、50分の授業の中で十分に結果を確認することができる。また、バイオリアクターは、作成後水につけた状態で5日間は十分にこの実験に使用するだけの活性を示す。さらに、実験に必要な器具も特別なものを必要とせず、簡単な操作で行うことができるため、これまでの酵素実験に比べて実施が容易であると考ええる。

V 参考文献

- 大須賀久美子・小谷良太郎(1990) 教材としてのバイオリアクター 生物教育 第30巻 第1号: 11
 松田 仁志(1994) 固定化酵母を用いた呼吸の実験 生物教育 第34巻 第4号: 292-297
 新田 光昭(1999) 肝臓破碎液を用いた固定化酵素の実験 生物教育 第39巻 第2号: 58-64
 (たかくわ まこと 生物研究室長)