

嫌氣的条件下で行う簡易代謝実験

- チャック付きポリ袋を使って -

高桑 純

チャック付きポリ袋の中にあらかじめ酵母懸濁液を入れておき、一定量のメチレンブルーとコハク酸ナトリウムを加えて口を閉めてから混合し、コハク酸デヒドロゲナーゼによるコハク酸の酸化を、メチレンブルーの脱色によって確かめる方法について述べた。この方法を用いると、ツンベルグ管（2種の液体を真空中で混合できるガラス器具）を使わなくとも、温度や基質の有無による反応の変化を、嫌氣的条件下で簡単に調べることができる。さらに、同じ方法を用いてアルコール発酵の活性やTTCによるクエン酸回路の活性を調べる実験についても述べた。

[キーワード] 高等学校理科 デヒドロゲナーゼ メチレンブルー チャック付きポリ袋 酵母

はじめに

デヒドロゲナーゼの反応は、好気呼吸に関する実験として教科書にも頻繁に取り上げられている。しかし、ツンベルグ管という特殊な器具を使うことや、脱気し嫌氣的条件下で行わなくてはならないことなどから、実施状況はかならずしも高くない。そこでここでは、市販のチャック付きポリ袋を使って、簡単な操作でデヒドロゲナーゼの活性を調べる方法について紹介する。さらに、同じく嫌氣的条件下で起こるアルコール発酵の実験についても同様の方法で行うことができるので、あわせて紹介する。

A メチレンブルーを用いてデヒドロゲナーゼの作用を調べる

1 材料

パン用ドライイースト、チャック付ポリ袋（40mm×50mm）、駒込ピペット、ガラス棒、温度計、湯、氷、ビーカー（200cm³・500cm³）、目玉クリップ（口幅40mm以上）、0.05%メチレンブルー（以下Mbと表す）、8%コハク酸ナトリウム溶液

2 方法

(1) ドライイースト1gを水19cm³に混ぜ、酵素液を作る。

- (2) 3枚のチャック付ポリ袋（A，B，C）を用意し、駒込ピペットでそれぞれに酵素液を3cm³ずつ加えて空気を追い出す（図1）。
- (3) 各ポリ袋を図2のように、できるだけ下の位置で折りたたむ。

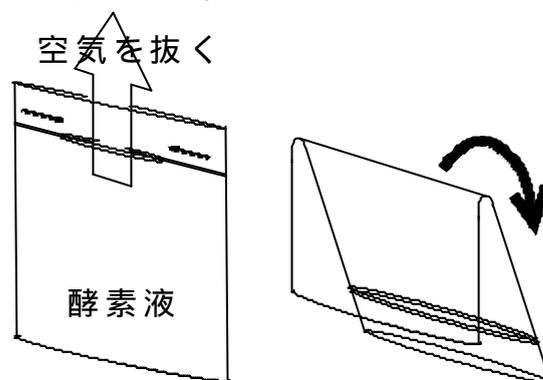


図1 空気を抜く 図2 折りたたむ

- (4) 図3のように、折った部分を目玉クリップではさむ。
- (5) 図4のように逆さにし、駒込ピペットを使ってクリップより上の部分（口に近い部分）に、AとBでは8%コハク酸ナトリウム溶液（基質）3cm³、Cでは水3cm³を入れる。
- (6) それぞれのポリ袋の同じ部分にMbを7滴ほど加え、空気を追い出してから口を閉める。
- (7) AとCは30℃の湯に、Bは氷水に入れ、1分後ほぼ同時にクリップをはずして中の液体

を混ぜ合わせ、Mbの色の変化を観察する。

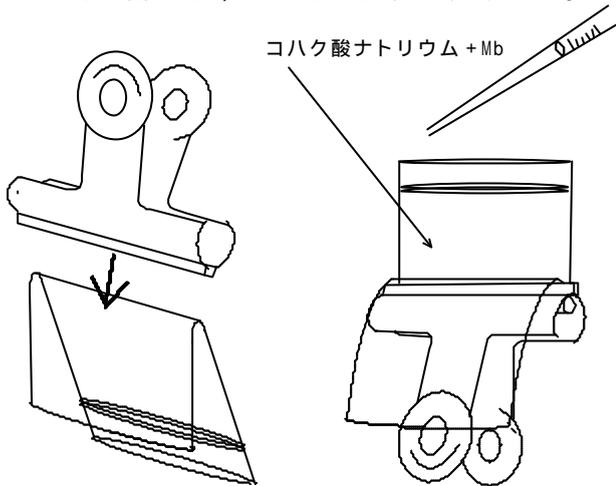


図3 クリップで 図4 基質や水を入れる
挟む

3 結果

(1) 2分ほどで図5のような色の変化が見られた。完全に空気を抜くことはできないため、ポリ袋にわずかに泡が残るが、Aのような脱色後の状態でも泡の表面がかすかに青く染まっていることから、この実験を嫌氣的条件で行わなくてはならない理由が理解できる。

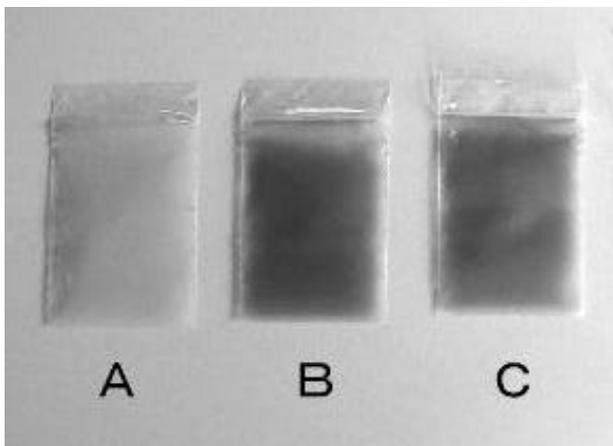


図5 Aの実験結果

(2) クリップを利用することによって、実験開始まで酵素液と基質をほぼ完全に分離しておくことができた。また、クリップをはずすというごく簡単な操作だけで実験を開始できるため、A～Cの3つの条件下でのMbの脱色に要する時間を同時進行で比較することができる。

4 参考

- (1) Mbは普通の状態では酸化されて酸化型Mb（青色）となっているが、コハク酸デヒドロゲナーゼの基質となるコハク酸から取り出された水素によって還元され、還元型Mbとなり無色に変わる。
- (2) デヒドロゲナーゼの活性をMbの色の変化で調べる方法は、ツンベルグ管を用いアスピレーターで脱気して行うのが一般的である。ツンベルグ管とアスピレーターがない場合は、試験管の液面と空気とを流動パラフィンで遮断する方法もある。この場合、すべての液を試験管に混合した後、流動パラフィンを液の上に2～3mmぐらい重ねて空気と遮断する。流動パラフィンを使う場合、実験後の試験管の洗浄が面倒である。ここでは、操作を簡素化するためにチャック付ポリ袋を密閉することで同じ環境を作っている。液中の溶存酸素を除去することはできないため、厳密には酸素が存在しないわけではないが、酵素反応を比較する上では問題ない。
- (3) 乾燥酵母の代わりに、ニワトリの胸筋(ささみ)や納豆菌、生きたアサリなど呼吸活性の強い材料を使うこともできるが、乾燥酵母のようにできるだけ簡単に用意できるものがよい。乾燥酵母は小分けにされているものが使いやすい。また冷凍しておけば、かなり長い間使用できる。
- (4) ドライイーストには呼吸基質となる物質がわずかに含まれているため、コハク酸ナトリウムを入れていないCでもやがて少しずつ脱色がおこる(図5)。
- (5) コハク酸デヒドロゲナーゼの阻害剤であるマロン酸を加えたものと加えないものとを比較することもできる。マロン酸を加えた場合は脱色しない。

B アルコール発酵の活性を比較する

1 材料

パン用ドライイースト、チャック付ポリ袋

(40mm×50mm), 駒込ピペット, ガラス棒, 温度計, 湯, 氷, ビーカー(200cm³・500cm³), 目玉クリップ(口幅40mm以上), 0.3Mブドウ糖溶液,

2 方法

- (1) ビーカーを3個用意し, 湯と氷を使ってそれぞれ0℃, 20℃, 40℃の水温に調節しておく。
- (2) ドライイースト1gを水19cm³に混ぜ, 酵素液を作る。
- (3) 3個のチャック付きポリ袋に, 実験Aの図1, 2のようにして酵素液を3cm³ずつ入れ, 図3のように, 折った部分を目玉クリップではさむ。
- (4) それぞれのポリ袋を, 実験Aの図4のように逆さにして, クリップより上の部分に0.3Mブドウ糖溶液をそれぞれ3cm³ずつ入れ, 空気を追い出してから口を閉める。
- (5) 各ポリ袋をそれぞれ水温を調節しておいた3個のビーカーに入れ, ポリ袋内の温度がビーカーの水温と同じになるまで1分ほど待って, 3個のポリ袋のクリップを一斉にはずし, 酵素液と反応液を混ぜ合わせる。
- (6) 10分後, ポリ袋にたまった気体の量を比較する。

3 結果

- (1) 10分ほどで気体の量にははっきりとした違いがでてくる。0℃のビーカーではポリ袋は全くふくらまないが, 40℃ではポリ袋一杯にアルコール発酵で発生した二酸化炭素がたまり, 20℃ではその中間の状態となる。この3つの条件では, アルコール発酵にとって40℃が最適な温度条件であるということが簡単に比較できる。
- (2) アルコール発酵の実験は, キューネの発酵管を用いるのが一般的であった。キューネの発酵管を使ってこの実験と同じ設定で行うためには, 発酵管を各班に3本ずつ用意しなければならないことや, 発酵管の温度調節と3つの温度条件の同時比較が難しいこと, 後始

末に手間がかかることなど, 実施しにくい要素がきわめて多い。この方法では, ポリ袋の温度調節も簡単で, ほぼ同時に3条件の実験を開始できるため, 10分間で結果が得られる。また, 後始末もきわめて簡単である。

4 参考

- (1) 気体が発生したポリ袋の口をわずかに開け, 注射器を使って10%NaOHを少量入れてやると, たまった気体の体積が急激に減ることから, 気体が二酸化炭素であることを確認させることができる。
- (2) この実験では最高で40℃に設定しているが, さらに温度を上げ, 60℃の条件を加えてもよい。この場合, 40℃に比べ60℃では高温のため気体の発生は抑制される。ただし, それ以上高温に設定すると, ポリ袋が変質する可能性がでてくる。
- (3) あらかじめアルギン酸ナトリウムを用いて酵母のバイオリアクターを作っておき, ポリ袋に入れるバイオリアクターの個数をいろいろ変えて, 一定時間後の気体の発生量を比較することもできる。ただしこの場合, バイオリアクターの周囲に多少空気が入るため, アルコール発酵によって発生した二酸化炭素の量を厳密に比較することにはならない。

C アルコール発酵と好気呼吸とを比較する

1 材料

パン用ドライイースト, チャック付きポリ袋(40mm×50mm), 駒込ピペット, ビーカー, 氷, ガラス棒, 試験管, 0.4%TTC溶液, 0.3Mブドウ糖溶液, 0.3Mクエン酸ナトリウム溶液

2 方法

- (1) ドライイースト1gを水19cm³に混ぜ, 酵素液を作る。
- (2) クエン酸ナトリウム溶液3cm³とTTC溶液1cm³を, それぞれ2本の試験管に取り, 反応液A, Bとする。
- (3) ブドウ糖溶液3cm³とTTC溶液1cm³を試験管に取り反応液Cとする。

- (4) 水 3 cm³とTTC溶液 1 cm³を試験管に取り反応液Dとする。
- (5) 4個のチャック付きポリ袋に、実験Aの図1, 2のようにして酵素液を3 cm³ずつ入れ、図3のように、折った部分を目玉クリップではさむ。
- (6) 実験Aの図4のように、逆さにしてクリップより上の部分にそれぞれA～Dを入れ、空気を追い出してから口を閉める。Bだけは氷水の入ったビーカーに入れる。
- (7) 4個のポリ袋のクリップを同時にはずし、酵素液と反応液を混ぜ合わせて、色の変化を観察する。

3 結果

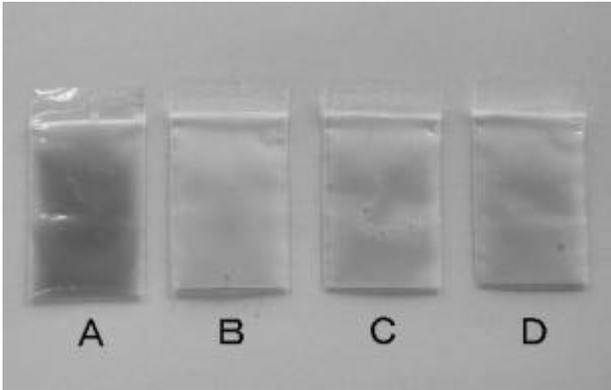


図6 実験結果

表1 実験条件と結果

	基質	温度条件	TTCの色の变化
A	クエン酸	室温	赤くなる
B	クエン酸	氷水	変化なし
C	ブドウ糖	室温	やや赤くなる
D	なし	室温	やや赤くなる

- (1) 室温にもよるが、10分ほどで図6のような色の変化が見られる。表1のように、Aではクエン酸が基質となるため、ミトコンドリアのクエン酸回路において生じる水素がTTCを還元し、赤く呈色する。Bでは低温により酵素活性がおさえられ、変色が起こらない。Cではブドウ糖が呼吸基質となるが、嫌気的条件下であるため大部分がアルコール発酵に利用され、TTCの還元がほとんど起こらない。

また、Dでは基質がないためTTCの還元がほとんど起こらない。ただし、CとDでわずかに変色するのが観察される。これは、パン用ドライイーストに含まれる不純物を基質としてわずかにクエン酸回路が進行し、TTCを還元したためと思われる。

- (2) 実験Bと同様に、アルコール発酵の実験は、キューネの発酵管を用いて行うのが一般的であったが、この方法でも同様の結果が得られることがわかった。

4 参考

- (1) TTC溶液とは、無色のテトラゾリウム塩(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride)の溶液である。これは、好気呼吸の盛んな細胞に浸透するとミトコンドリアで還元され赤色の脂溶性のTPF(Triphenylformazan: フォルマザン)となる。
- (2) Bのポリ袋を氷水で冷やすかわりに、あらかじめBに入れる酵素液だけを一度加熱してから室温まで冷やして用いても同様の結果となる。

参考文献

- 松田仁志 固定化酵母を用いた呼吸の実験 生物教育 34巻(4号): 292-297 1994
- 川島政吉 TTCを用いた呼吸の実験 平成9年度全国理科教育センター研究協議会並びに研究発表会生物部会研究発表集録 1997
- 高桑純 バイオリアクターを用いた酵素実験 北海道立理科教育センター研究紀要 第12号 pp.78-79 2000
- 高桑純 チャック付きポリ袋を使ったデヒドロゲナーゼの実験 北海道生物教育会誌 第24号 pp.53 2002

(たかくわ まこと 生物研究室長)