

納豆のねばねばで水質浄化

國重 明日香 藤田 陽光 米田 美波

1. 緒言

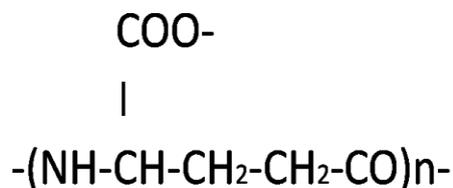
私たちは、納豆の糸の成分であり、凝集力や水溶性、生分解性に富んだポリグルタミン酸に興味を持ち、市販の納豆からポリグルタミン酸を抽出して、その特性を生かした水質浄化剤ができないかと考えた。また、ポリグルタミン酸がアミノ酸の高分子であることに着目し、ポリグルタミン酸が熱変性するのかについても興味をもった。これらを検証するために以下の作業を行った。

- ・納豆からのポリグルタミン酸の二通り(簡易・高分子)の抽出とそれらの比較
- ・凝集力や熱変性の有無の確認

2. ポリグルタミン酸について

ポリグルタミン酸の中でも納豆から抽出できるのは γ -ポリグルタミン酸である。

γ -ポリグルタミン酸(以下PGA)は納豆菌(*Bacillus natto*)が煮大豆のタンパク質や炭水化物を養分として分解するとき生成する物質であり、うまみ成分であるグルタミン酸が多数ペプチド結合したもの。疎水性の部分($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)と親水性の部分($\text{COO}-$)が両方あることで水にねばりをもたせていると考えられる。



3. PGAの抽出実験

< I. 簡易抽出 >

- ①納豆(1/2パック)をよく混ぜたものに水を納豆が浸かるくらい加え、よく混ぜた後、ガーゼでこして豆を取り除き、PGA水溶液を作成する。
- ②作成したPGA水溶液に99.5%エタノール(キシダ化学, 特級)を投入し、水層とエタノール層に分離させる。
- ③境界面に分離したPGAをガラス棒で絡め取る。
- ④回収したPGAを十分に自然乾燥させ、乳鉢と乳棒を用いて粉末にする。

< II. 高分子抽出 >

- ①炭酸ナトリウム水溶液(キシダ化学, 1級)70mlに納豆(1/2パック)を加え、ガラス棒でかき混ぜながら70°Cで湯煎する。
- ②納豆から泡が出なくなるまで(約5分)加熱したら、吸引濾過して豆を取り除く。
- ③濾液にクエン酸(島津薬品, 1級)を加えてpH3~4に調整する。
- ④塩化ナトリウム(半井化学薬品, 特級)を飽和するまで加える。
- ⑤Iと同様に、エタノールを投入し、二層の境界面に分離したPGAをガラス棒で絡め取り、十分に自然乾燥させた後粉末にする。

<Ⅲ. 熱変性について>

- ①PGAの熱変性の有無を確認するため、Ⅰ、Ⅱで作成したPGAの一部を電子レンジ（80℃）でそれぞれ加熱する。
- ②4種類（Ⅰ：加熱なしⅠ：加熱有Ⅱ：加熱なしⅡ：加熱有）の粉末（0.05g）を入れた試験管に水をスポイドで一滴（0.02g）ずつ入れ、粉末が全て溶けたときの水の量でそれぞれの溶解度を計算する。

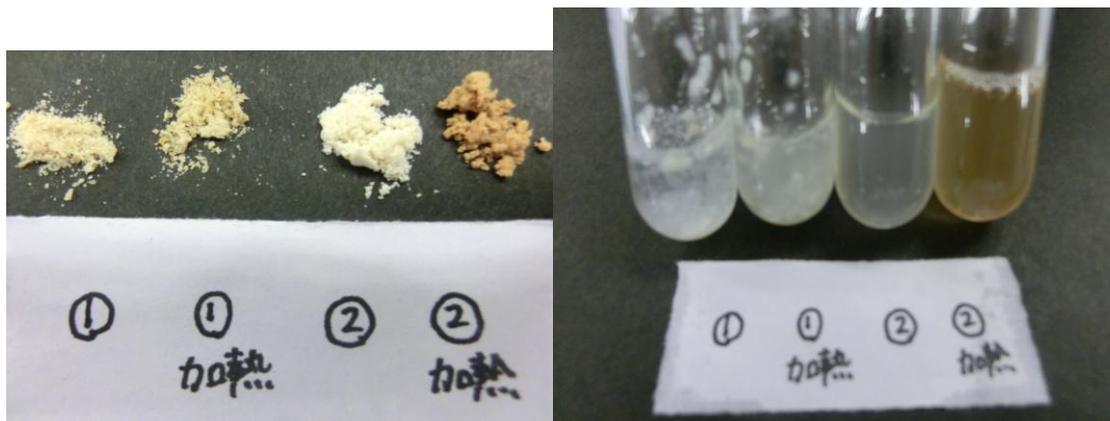
4. 3. の結果（出来たPGAの性質）

A、色

抽出してすぐのPGAは、Ⅰは白く繊維状でⅡは白くガム状だった。自然乾燥させた後のPGA粉末のⅠ（加熱なし）は薄茶色、Ⅰ（加熱有）は黄茶色、Ⅱ（加熱なし）は白色、Ⅱ（加熱有）は濃茶色になりⅠ、Ⅱどちらも加熱すると色が変わったが、Ⅱの方が色の変化が大きかった。

B、水溶性

Ⅰ（加熱なし）の溶解度は0.1以下、Ⅰ（加熱有）は0.1以下、Ⅱ（加熱なし）は5.0、Ⅱ（加熱有）は25となり、Ⅰは加熱の有無に関わらず溶解度は小さかったが、Ⅱは加熱すると溶解度が大きくなった。色と水溶性について、加熱による変化はⅡの方が大きかった。



5. 凝集力の比較実験

3の実験で作成したPGA粉末を用いて凝集力の比較の実験を行った。

用意した粉末は簡易PGAの加熱あり、なしと高分子PGAの加熱あり、なしである。

これらの粉末で各5g/lの水溶液を作り、遠心分離機にかけた上澄みを1滴～8滴まで泥水に滴下し観察した。（この実験で用いた泥水は、より凝集力を比較しやすくするために3mlの水に一定量の泥をまぜて泥水とした。）



PGAあり PGAなし

PGAあり PGAなし

6. 5. の結果(凝集力の比較)

①簡易 PGA(加熱なし)	凝集力 大(6滴のときが最大)
①簡易 PGA(加熱あり)	凝集力 大(総じて凝集力が高い)
②高分子 PGA(加熱なし)	凝集力 中
②高分子 PGA(加熱あり)	凝集力 微小

(0～5滴には目立った変化は見られなかった。)

7. 5. の考察

①簡易PGAと②高分子PGAでは加熱あり、なしともに①の方の凝集力が高かった。

粘度に注目してみると、できたての時は②の方の粘度が高かったが、水に溶かしてみると溶解度の高い②の粘度は薄まった。さらに②の凝集力が小さかったことから、凝集力の大小には粘度が関係していると考えた。このことは、②の加熱なしよりも溶解度の高い加熱ありのほうの凝集力が低くなっているということからも見て取れる。

また①の加熱あり、なしで比べてみると、①の加熱なしでは6滴で凝集力が最大となり、入れる量によって結果にばらつきがあったが、①の加熱ありは総じて凝集力が高く、量の多少は凝集力に影響を与えていない。しかし①の加熱ありの凝集力がその量の影響を受けていない理由については分かっていない。

8. まとめ

- ・2通りの抽出方法で明らかに性質の異なるPGAができた。これは水溶性の違いなどに見ることができる。
- ・熱により①は色と凝集力、②は色、水溶性、凝集力が変化した。
- ・水質浄化の効果は粘度の高い①が大きかった。

9. 謝辞

今まで多大なるアドバイスや資料をくださった喜多村先生をはじめとする生物科の先生方、化学科の先生方ありがとうございました。

また富士フィルムファインケミカルズ(株)、日本ポリグル(株)、星光PMC(株)の方にはメールでたくさんのアドバイスを頂きました。ありがとうございました。

細胞融合とその育成

村田篤哉 森下拓也 吉野聖人

1. 緒言

近年、分子生物学、いわゆるバイオテクノロジーや、iPS 細胞を筆頭とする再生医療が世界中で盛んに研究されている。中でも、遺伝子組換えや細胞融合といった、人為的に調整された環境下で遺伝子や細胞を制御する技術が進展しており、それによる我々への影響も少なくない。

事実、近年外国からの輸入作物などで遺伝子組換えという言葉をよく耳にするようになった。このように生物学が日々研究され、そして我々の生活と深く関わりあうようになった今、私たちはある植物に興味を持った。それは、「ポマト」という植物である。聞き馴染みのない植物であるが、実はこれはジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) とトマト (*Solanum lycopersicum*) という異種の植物どうしを融合させてできた、人為的野菜なのだ。なんとユニークな野菜であろうか。自然では起こり得ないであろう異种植物の融合であり、またその野菜の味や見た目は私たちの想像の域を越えている。私たちはこのような新種の植物を自分たちの手で作れるのではないかと感じ、植物の異種間どうしの融合、すなわち細胞融合に興味をもち、調べてみることにした。そして、我々はある先輩方の報告書を目にした。

それは我々の思い描いている細胞融合の構想と類似している点が多く見受けられた。ニンジン (*Daucus carota* subsp. *Sativus*) とアロエ (*Aloe barbadensis* var *mirror*)、名付けて「キャロエ」である。そこには次のような研究方法が示されていた。試料から細胞を抽出し、プロトプラストという融合可能な状態にしてから細胞融合を行う。まさに我々が求めていた方法ではないか。しかし、先輩方の研究はプロトプラストの融合の段階まで進展したが、その後の育成に関しては思うような結果を得られていなかった。そこで、我々はその原因を試料間の相性が悪かった為であると考え、近縁種の試料同士で研究を行うことにした。

2. 方法

1. プロトプラストの形成

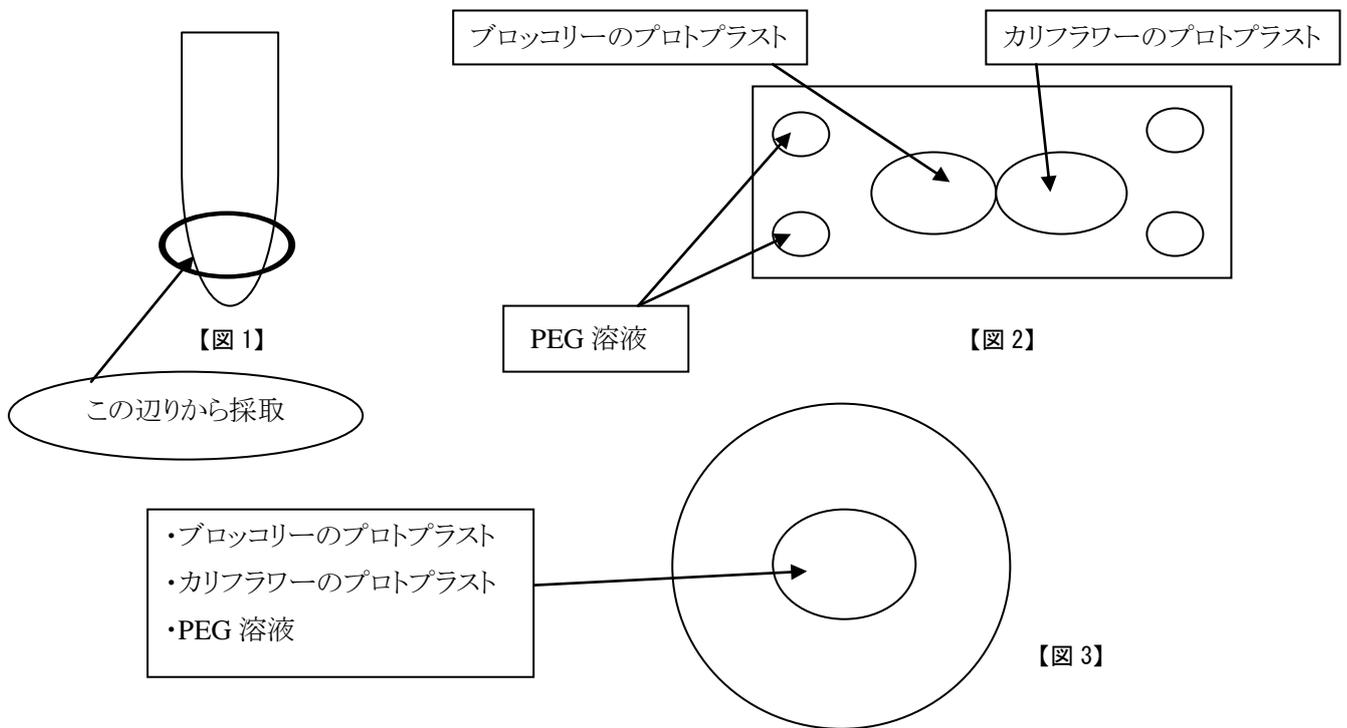
- ①試料を 2mm 角程の大きさに切る。
- ②0.5M マンニトール 9.1g、1.0%セルラーゼ・オノズカ R-10 1.0g、0.2%マセロザイム R-10 0.2g、0.01%ペクトリアーゼ Y-23 10mg、3.5%KCl 3.5g、0.5%CaCl₂ 0.5g が入った酵素液 100ml の中に入れて、5~7分アスピレータを用いて減圧処理する。
- ③減圧処理後、30°Cの恒温槽に移し 15分間温め酵素反応を行わせる。この際、5分毎に数回振る。
- ④酵素液から試料を取り出す。

2. 融合

- ①試料を取り出した酵素液を 5分間静置させる。
- ②【図 1】で丸く囲んだあたりの酵素液をスポイトで吸い取り、プレパラートに置く。
- ③プレパラートの四隅に PEG 溶液 (40% ポリエチレングリコール 4000 40g, 5mM CaCl₂ 56mg) を滴下し【図 2】、ようじで混ぜ合わせる。

3. 培養

①寒天培地 (MS 培地 200ml、ショ糖 10g、寒天 3.15g) を作り、そこに③の酵素液と濾過したポリエチレングリコール溶液 (PEG 液) を滴下して【図 3】融合させ、その経過を観察する。



3. 結果

①レモン (*Citrus limon*) の表皮の裏側からのプロトプラストの抽出

抽出には成功した。抽出したプロトプラストの大きさは $51 \mu\text{m}$ ほどであった。

②タマネギ (*Allium cepa*) の根からのプロトプラストの抽出

ほとんど抽出することができなかった。

③ブロッコリー (*Brassica oleracea var. italica*)、カリフラワー (*Brassica oleracea var. italica*) のプロトプラストの抽出

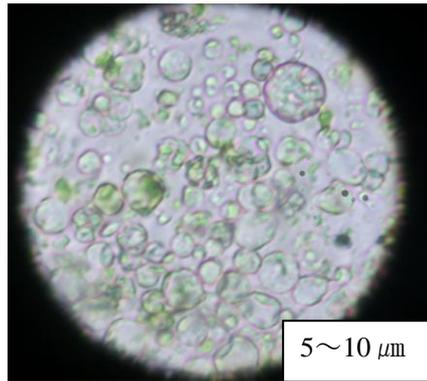
抽出には成功した。抽出したプロトプラストの大きさは $5 \sim 10 \mu\text{m}$ ほどであった。【写真 1】

④ブロッコリーとカリフラワーのプロトプラストの融合

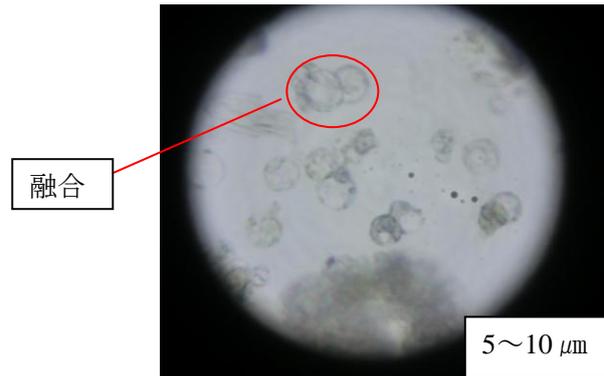
二つのプロトプラストを融合させることができた。【写真 2】

⑤融合したプロトプラストの培養

5 回の実験すべてにおいてカビが発生してしまった。



【写真 1】



【写真 2】

4. 考察

①について

レモンの表皮の裏側から採取した細胞は、内側にある種や果肉などを守る働きのためのため、今後成長する見込みはない。つまり、育成を見据えた今回の実験では適さない。

②について

そもそも根の細胞は自身の細胞の浸透圧と土壌水の浸透圧との差を利用して、水を吸収しているため根の細胞における浸透圧は比較的高いと考えられる。しかし、今回使っている酵素液は植物の果肉や葉など、いわゆる老細胞に対して適切な濃度に調整されているので、根の細胞にとって酵素液の浸透圧はとても低いと考えられる。そのため、根の細胞内へ多量の水が流入してしまう。また、プロトプラストにしており、細胞壁が存在していないため、膨圧が発生せず、そのまま水の流入が続きプロトプラストが破裂してしまい見ることができなかったと考えられる。

③について

成長する見込みが期待できる部位として、根の次に芽が考えられたためブロッコリーの芽で実験を行った。すると、レモンより小さいプロトプラストの抽出に成功した。ブロッコリーということもあり、プロトプラストは緑色がかっていた。

ブロッコリーから、プロトプラストの抽出に成功したため、近縁種にあたるカリフラワーからのプロトプラストの抽出を試みた。抽出は成功し、その大きさはブロッコリーと同様 5 μmであった。また、色はカリフラワーということもあり、無色であった。

④について

2つのプロトプラストの抽出に成功したため、融合を試みた。融合とは、複数のプロトプラストがくっついている状態のことをいう。二つのプロトプラストがくっついている様子が観察されるので、融合成功といえる。

⑤について

実験を繰り返し、プロトプラストの抽出が確実となってから培養を試みた。しかし、培養をした5回の実験すべてにおいてシャーレにカビが発生してしまった。【写真 3】主な理由としてはプロトプラストの抽出の際に用いた酵素液や、融合の際に用いた PEG 溶液の中に菌や細菌が混入していたためと考えられる。そこで、酵素液や PEG 溶液を濾過滅菌して実験を繰り返したが、結果は変わらなかった。



【写真3】

5. 結論

- 1.融合に適した小さく、若いプロトプラストを作り出すことができた。
- 2.根のプロトプラストは水を多量に吸い、破裂してしまうため今回の実験には適さない。
- 3.完全な滅菌状態の維持は非常に難しく、ここが一番大きな課題となっている。

6. 参考文献

甲南大学バイオテクノロジー教材開発チーム

7. 謝辞

私たちの研究に対してたくさんの助言を与えてくださった、甲南大学バイオテクノロジー教材開発チームの皆様、そして私たちをいつも支えてくださった中根先生、高木先生をはじめ、生物の先生方のおかげで研究をすることができました。この場をお借りして、お礼申し上げます。

粘菌生活

十亀咲子 留河愛梨 間島千晴

1. 緒言

私たちは粘菌に興味を持ち、生態について調べるために主にテーマを2つに絞って研究を行いました。

テーマ1 ; 粘菌と浸透圧の関係

テーマ2 ; 粘菌と明暗の関係

研究一覧

A 菌核

B 刺激と記憶

C 嫌いなものを調べる <テーマ1>

D 好きなものを調べる <テーマ2>

E 明暗実験 ver.1 ver.1.5 <テーマ2>

F 餌の認識 <テーマ2>

G 明暗実験 ver.2 <テーマ2>

2. 実験

A. 菌核

<導入>

長期休暇後、粘菌が動かなくなっており、調べてみると菌核という保存状態であるとわかった。菌核は環境を良くすると、再び変形体となり動き出すことがわかったが、環境の良し悪しは餌の有無によるのかを確認するため以下の実験を行った。

<方法>

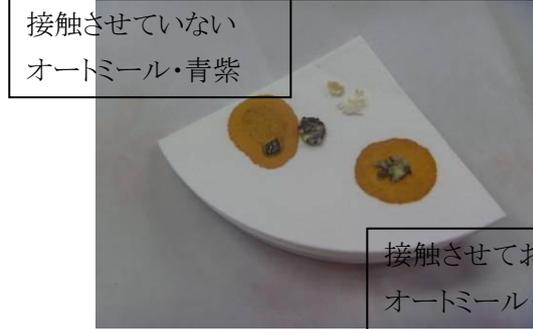
粘菌を普段と同じ培地に置き、オートミール(日本食品製造合資会社)を粘菌に接触させておく。

<結果>

初めのうちは菌核のままであったが2、3週間後動き出した。粘菌に接触させておいたオートミールにイソジン(明治製菓株式会社)をかけて、でんぷんが存在するか調べると、オートミールの色は変化せず、対象実験として粘菌に接触させていないオートミールに同様の処理を行うと青紫色に変わったことから、粘菌がオートミールの中のでんぷんを食べたことが分かった。

<考察>

粘菌がでんぷんを吸収していることが分かったので、粘菌は環境が良くなったことで再び変形体となって動き出したのではないかと考えられる。



B. 刺激と記憶

<導入>

粘菌に刺激を与えると、動きが鈍くなることが分かっている。しかし、刺激を与えなくても、以前の刺激を記憶するため、同様の結果が見られる。私たちは、粘菌の刺激伝達の仕組みを調べるための準備として以下の実験を行った。



<方法>

粘菌を刺激する回数ごとに分けて、それぞれが30分毎にすすんだ距離を計測する。この実験によって、粘菌が記憶を持続する時間を調べる。

<結果>

刺激することによって、進行方向が変わったため、正確な距離が測定できなかった。

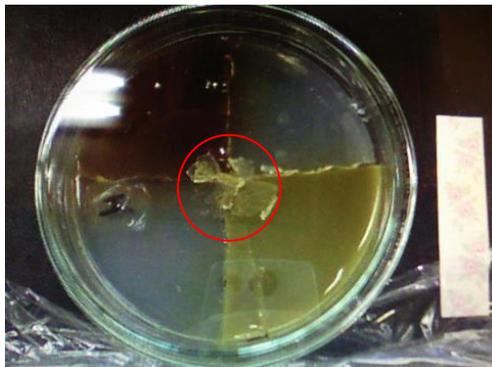
<考察> 粘菌は刺激されると進行方向を変えるのではないか。

C. 嫌いなものを調べる (ver. 1)

<導入>

粘菌は最短経路をたどる性質があることから、鉄道の路線を設計するときに用いられるが、その時山などの鉄道にとっての障害となるものを粘菌が避けるように障害物のあるところに粘菌の嫌いなものを付着させる。粘菌が嫌いなものには共通する性質があるのか調べるために、以下の実験を行った。

<方法>



寒天を液状に溶かし、その中にコーヒーの粉末、緑茶の粉末、砂糖、エタノール（蒸発している）を入れて寒天を作る。それをシャーレ上に並べ、中心に粘菌を置き粘菌の動きを調べる。

<結果>

最終的に粘菌はもとの位置にとどまった。

<考察>

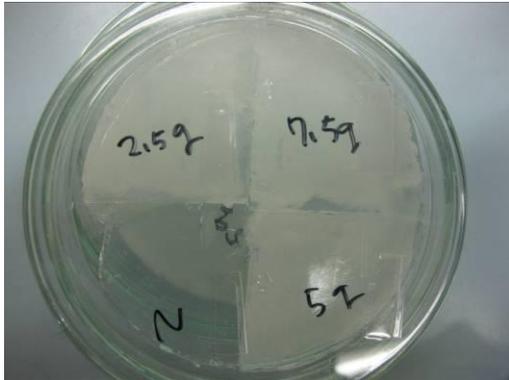
粘菌が動かなくなったのは寒天に溶質が溶け込み浸透圧が高くなったからもとの最も濃度の低い寒天にいた

のではないかと推測し、以下の実験を行った。

嫌いなものを調べる (ver. 2)

<方法>

濃度の異なる寒天を4つ作り、写真の様に配置し、中央に粘菌を置き、どの寒天に移動するか観察した。



<結果>

粘菌は最も濃度の低い寒天に移動したが、餌を求めたのか、最も濃度の低い寒天の淵に沿って、移動し続け、最終的に二番目に濃度の低い寒天に移動した。

<考察>

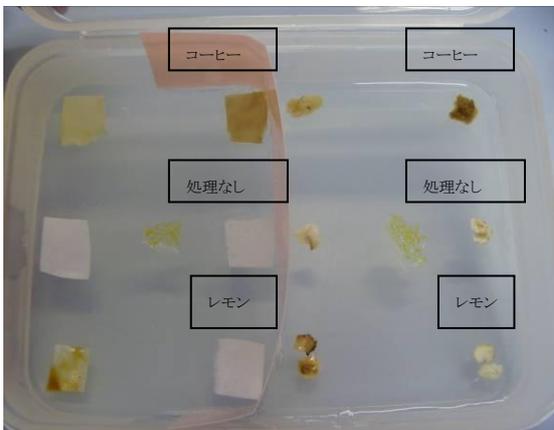
粘菌は濃度が低く、浸透圧が小さい寒天に移動することが分かったので、part1 で動かなかったのは、元々粘菌が乗っていた寒天が最も濃度が低かったことが、原因の一つと考えられる。

D 好きなものを調べる

<導入>

嫌いなものを調べたため、好きなものにも興味を持ち、以下の実験を行った。

<方法>



オートミール（粘菌の餌）にコーヒー、緑茶、砂糖、レモン、エタノール、を染み込ませる。

味を染み込ませたもの5種類と処理をしていないもの1種類、計6種類のオートミールを寒天上に置き、粘菌の動きを調べる。また好きな味と匂いに違いがあるか調べるためにオートミールと同様の処理をろ紙に行なって実験する。

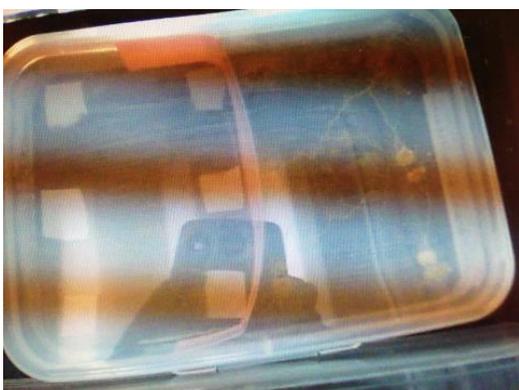
<結果>

ろ紙の実験では、ノーマル（処理無）からコーヒーに移動し、オートミールでは、レモンからノーマルに移動した。よって粘菌が特定の物質に集まる傾向は見られなかった。

<考察>

好きな物質は分からなかったが、粘菌はいずれも下から上に移動した。また粘菌を撮影した際、その映像の中に何かの影があり、その影も下から上へ動いていた。

粘菌の動きと影の動きが同じであるため、このことに関連があるのか調べるため以下の実験を行った。



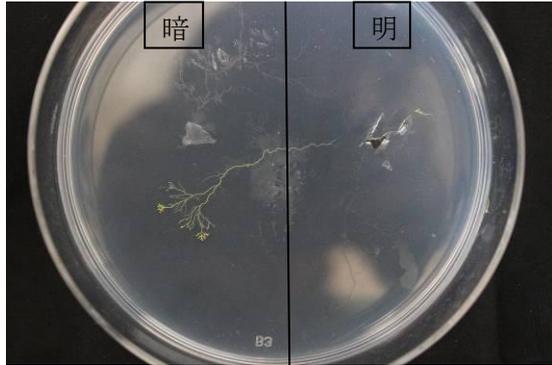
E 明暗実験 ver. 1

<導入>

粘菌が影の動く方向に動いたため、粘菌は暗い所に移動したのではないかと考え、粘菌が明るい所と暗い所のどちらに移動するのか調べた。

<方法>

寒天で培地を作ったシャーレの中心に、モジホコリを置き、シャーレの半分は光が当たらないように黒い布をかぶせ、モジホコリの動きを30分ごとに観察した。



<結果>

粘菌は最初四方に広がっていたが、粘菌の一部が暗い方に向かって移動し始め、最終的に暗い方に一本の太い筋が形成され、粘菌が一斉に暗い方に動き出した。

<考察>

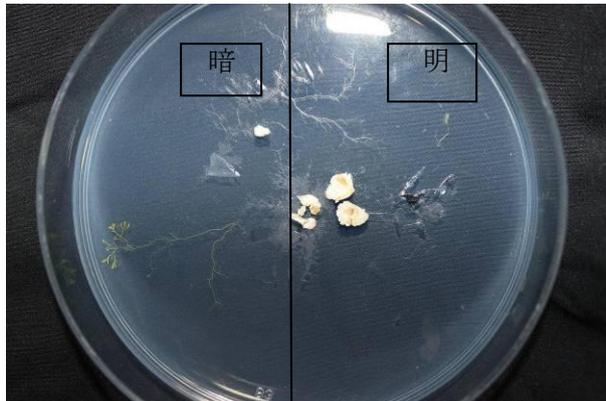
粘菌は暗い方に移動する。

明暗実験 ver. 1. 5

<導入>

粘菌が暗い所へ移動することは分かったが、粘菌が快適な環境を優先し、えさがなくても暗い場所にとどまるか、餌がある明るい所へ移動するのか調べた。

<方法>



明暗実験 ver. 1 で完全に暗い方に粘菌が移動した後、明るい方に餌を置き、観察する。

<結果>

粘菌が餌の方に動く様子を見ることはできなかった。

<考察>

粘菌は餌よりも快適な環境を優先するのではないかと思ったが、餌と粘菌が接触していなかったため、粘菌が餌を匂いで認識できるのか疑問に思った。

F 餌の認識

<導入>

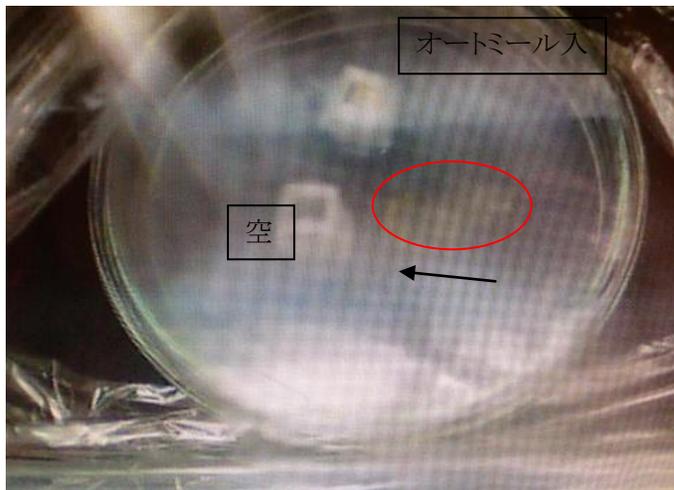
E 明暗実験 ver. 2 で粘菌が餌を選ぶか快適な環境を選ぶのかを調べようとしたが、そもそも粘菌が接触していなくても餌を認識しているのか不明である。そこで粘菌は、オートミールに接触する前から餌と認識して群がっているのか、直面した障害物に群がった結果、それを餌として認識できるのかどうか調べるため以下の実験を行った。

<方法>

ろ紙で立方体を二つ作り、一部に穴をあけて寒天に埋め込み、一方の箱には、オートミールを入れ、もう一方には何も入れないでおく。その二つの立方体とほぼ等距離に粘菌を置き、粘菌が餌の入った立方体に群がるか調べた。

<結果>

粘菌は最初に直面した何も入っていない箱に群がった。



<考察>

粘菌が普段、餌と認識して群がっているわけではなく障害物に直面すると群がること分かったため、実験Eの粘菌とオートミールが接触していない状況では、優先順位は調べないと分かった。

明暗 part1 から粘菌は、光を避けて暗い所に移動することが分かった。ある実験で粘菌が乾燥したところを避けることを確認した。光にあたることを嫌っているのか(負の光走性)、一般的に光の当たっているところが、乾燥しているから明るい場所を避けたのか調べるため

めに以下の実験を行った。

明暗 part 2

<導入>

ある実験で粘菌が乾燥したところを避けることを確認した。光にあたることを嫌っているのか(負の光走性)、一般的に光の当たっているところが、乾燥しているから明るい場所を避けたのか調べるために以下の実験を行った。乾燥を嫌うのか、光を嫌うのか調べる。

<方法>

本来の状態と異なる環境の培地 A、B を作る。

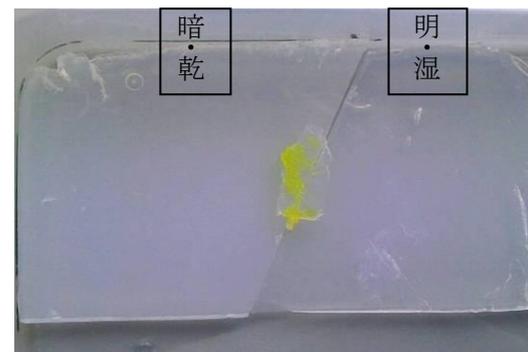
培地 A : 黒い紙で覆い光が当たらないが、水分量の少ない培地

培地 B : 光が当たるが、水分量の多い培地

A、B の境目に粘菌を置き、粘菌の動きを 1 時間ごとに撮影する。

<結果> この実験を 2 回行った結果、2 回とも分裂して培地 A、B に分かれた。

<考察> 粘菌は光を嫌うのか、光によって培地が乾燥することを嫌うのかわからなかった。



<実験全体のまとめ>

明暗実験から、粘菌は暗いところを好むことが分かった。

好き嫌いの実験から、粘菌は浸透圧の低いところに移動する。

しかし、上記の性質が決まり切った行動パターン(負の光走性)なのか、状況に応じて行動を変えるのかはわからなかった。

粘菌は接触してないと餌を認識できないことがわかったため、好きなものの実験で粘菌が移動す

る物質に傾向が見られなかったとわかった。

<参考文献>

<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%A4%E3%82%B0%E3%83%8E%E3%83%BC%E3%83%99%E3%83%AB%E8%B3%9E%E6%97%A5%E6%9C%AC%E4%BA%BA%E5%8F%97%E8%B3%9E%E8%80%85%E3%81%AE%E4%B8%80%E8%A6%A7>

<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%A2%E3%82%B8%E3%83%9B%E3%82%B3%E3%83%AA>

<謝辞>

本研究を進めるにあたって、積極的なご指導、たくさんの助言をいただいた先生方にこの場を借りて心から感謝いたします。

アルコール発酵 ～こんぶに秘められた力～

小嶋進太郎 権野直輝 濱斉之 森脇真郁 山添恵介 和田瑞穂

1. 緒言

先輩方の研究で酵母菌に海藻を加えると、アルコール発酵が促進されると分かった。

その研究に興味を持ったので、この研究結果から次の二点について調べた。

- ①アルコール発酵を最も促進する海藻は何か。
- ②アルコール発酵を促進させている物質は何か、またその性質はどのようなものか。

2. 実験(I)

この実験ではドライイースト(オリエンタル酵母工業株式会社製)、スクロース(三栄化工株式会社製)、市販の昆布、ひじき、もずく、蒸留水を用いた。昆布、ひじき、もずくは強力小型粉砕機 Force mill(ケニス株式会社製)で粉々にした。

三角フラスコ(TOP社製)4つに、それぞれ20%スクロース溶液50ml+ドライイースト5g+各海藻1.0gを加え、水温を40℃に保った恒温器(ADVANTEC社製 TBA081BA)につけて、発生したCO₂を、水で満たして逆さに置いたメスシリンダーに集めその量を5分おきに測定した。



図1 実験装置

(1) 実験 I の結果

ドライイースト単独よりも、昆布を加えたほうが二酸化炭素発生量は二倍以上に増えた。また、もずくを加えると二酸化炭素が発生しなかった。

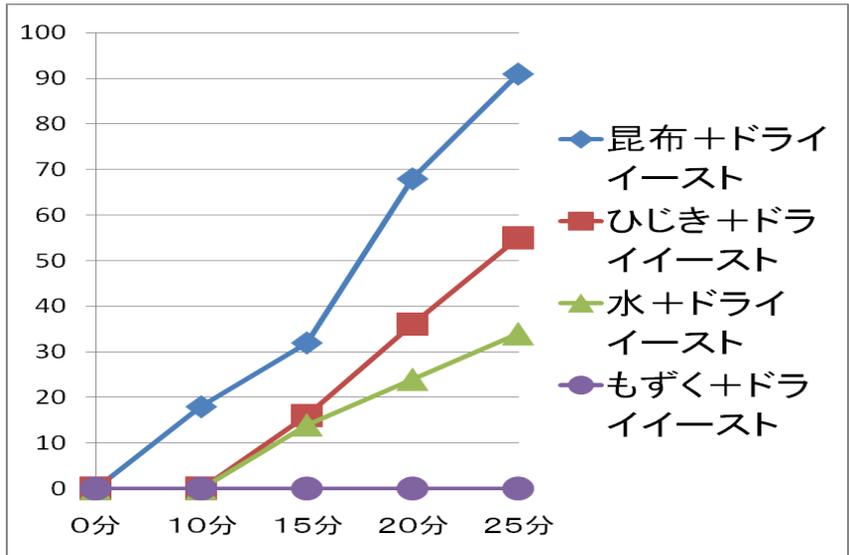


図2 各種海藻の発酵作用

(2) 実験Ⅰの考察

昆布が最も発酵を促進するということが分かった。一方、もずくはアルコール発酵を阻害していると考えられるが、今回は昆布の発酵促進作用を研究対象とした。そこで、このアルコール発酵促進物質の性質及びアルコール発酵促進の仕組みを調べることにした。

3. 実験(Ⅱ)

昆布に含まれる促進物質の熱に対する性質を調べるために次の A~C を用いて実験Ⅰと同じ手順で実験した。

A ドライイースト 5g+昆布粉末 1.0g+20%スクロース溶液 50ml

B ドライイースト 5g+加熱した昆布粉末 1.0g+20%スクロース溶液 50ml

(加熱は昆布粉末を沸騰水中で 10 分間おこなった。)

(1) 実験Ⅱの結果

加熱した昆布を加えた場合は、加熱していない昆布を加えた場合より二酸化炭素発生量が減少した。

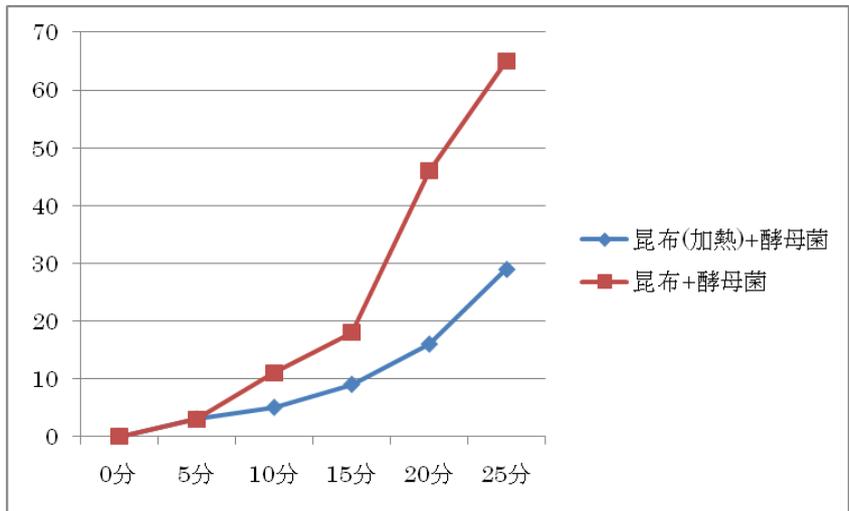


図3 熱に対する性質

(2) 実験Ⅱの考察

昆布に含まれているアルコール発酵促進物質は熱に弱いと考えられる。

4. 実験(Ⅲ)

昆布の持つアルコール発酵促進物質は実験Ⅱから熱に弱いということが分かったので、それを酵素ではないかと考えた。そこでドライイーストの代わりに昆布を加えて、アルコール発酵の基質が分解されるのかを調べるために、(i)(ii)の実験をした。

(i) 20%スクロース溶液 50ml に昆布粉末 1g を加えた。

(ii) ・A ピルビン酸 1g に昆布粉末を 1g 加えた。

・B ピルビン酸 1g にドライイースト 1g を加えた。

(1) 実験Ⅲの結果

(i) 二酸化炭素は発生しなかった。

(ii) A では二酸化炭素が発生したが、B では二酸化炭素はほとんど発生しなかった。

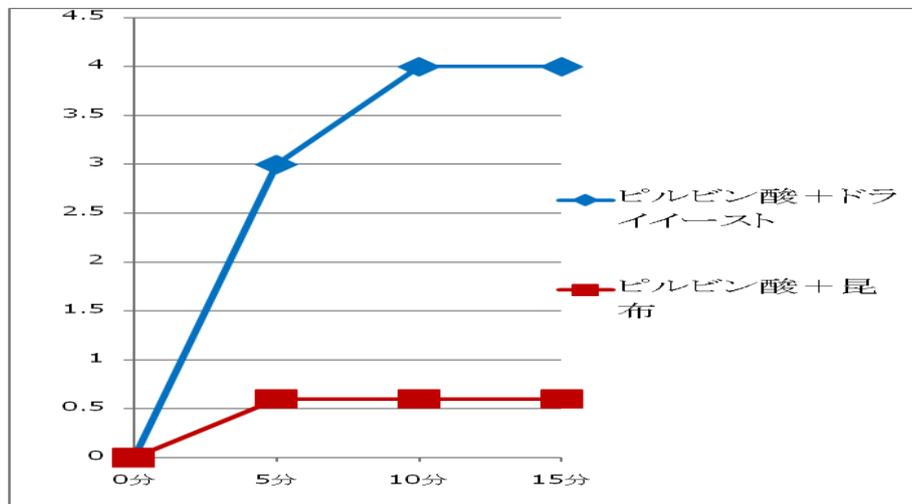


図4 ピルビン酸を基質とした場合

(2) 実験Ⅲの考察

昆布はスクロースをエタノールに分解するのに必要なすべての酵素を持ってはいない。また、ピルビン酸を分解する酵素(ピルビン酸デカルボキシラーゼ)を持っていない。しかし、アルコール発酵にかかわる多種類の酵素のうち、いずれかを持っている可能性はある。

5. 実験(Ⅳ)

昆布に含まれる物質以外の物質などがアルコール発酵を促進している可能性もあると考えた。そこで、昆布に付着している NaCl がアルコール発酵にどのようにかかわっているかを調べるため、水洗いした昆布を用いて次の A~D を用いて実験Ⅰと同じ手順で実験をした。

A ドライイースト 5g + 20%スクロース溶液 50ml

B NaCl 1.5g + ドライイースト 5g + 20%スクロース溶液 50ml

C ドライイースト 5g + 昆布粉 1g 末 + 20%スクロース溶液 50ml

D NaCl 1.5g + ドライイースト 5g + 昆布粉末 1g + 20%スクロース溶液 50ml

(1) 実験Ⅳの結果

A と B、C と D の二酸化炭素発生量がほぼ同じであった。

(2) 実験Ⅳの考察

この結果より、昆布に付着した NaC l はアルコール発酵に影響を与えないと考えられる。

6. 実験(V)

実験Ⅳと同じ考えで、昆布に付着している微生物が、アルコール発酵を促進させているのではないかと考えた。そこで、付着した微生物を 99.5%エタノールで殺した昆布を用いて実験した。

A 昆布粉末+ドライイースト 5g+20%スクロース溶液 50ml

B エタノールで洗った昆布粉末+ドライイースト 5g+20%スクロース溶液 50ml

(1) 実験Ⅴの結果

A と B では二酸化炭素発生量はほとんど同じだった。

(2) 実験Ⅴの考察

この結果より、昆布に付着している微生物は二酸化炭素発生量に影響を与えていなかった。

7. 実験(VI)

昆布にはアルコール発酵を阻害する条件を取り除く働きがあるため、結果として酵母菌がより多くアルコール発酵を行っているのではないかと考えた。

そこで反応生成物であるエタノールをあらかじめ高濃度にしておき、昆布を加えるとアルコール発酵が促進されるかどうかを調べた。

A ドライイースト 5g+10%エタノール 50ml+昆布粉末 1.0g+20%スクロース溶液 50ml

B ドライイースト 5g+10%エタノール 50ml+20%スクロース溶液 50ml

C ドライイースト 5g+20%スクロース溶液 50ml

(1) 実験Ⅵの結果

C では二酸化炭素が発生したが、A、B は共に全く発生しなかった。

(2) Ⅵの考察

C のみ二酸化炭素が発生したので、高濃度のエタノールの存在で発酵が妨げられることが分かった。

また、昆布を加えても二酸化炭素の発生量は増加しなかったため、昆布はエタノールを分解することはできないと考えられる。

8. 実験(VII)

基質が増加すれば、アルコール発酵の量も増えるので、昆布自体がアルコール発酵の基質になっているのではないかと考えた。そこでスクロースを基質とした場合と昆布を基質とした場合を比較するため、次のA~Bを用いて実験した。

A ドライイースト 5g+20%スクロース溶液 50ml

B ドライイースト 5g+昆布粉末 1.0g+水 50ml

※この実験では今までと違いAにしかスクロース溶液を入れていない。

(1) 実験VIIの結果

二酸化炭素はAでのみ発生し、Bでは、発生しなかった。

(2) 実験VIIの考察

この結果より、昆布はアルコール発酵の基質となっていない。

9. 結論

アルコール発酵を最も促進する海藻は昆布である。

アルコール発酵を促進させる物質は昆布に付着しているNaClや微生物ではなく、昆布自体に含まれている。その物質は熱に弱く酵素ではないかと推測されたが、特定はできなかった。

また、アルコール発酵で生成したエタノールによって、酵母菌の活性が低下するのを昆布が防ぐのではないかという考えは否定された。さらに、昆布自体がアルコール発酵の基質となるのではない事も分かった。今のところ何らかの酵素が昆布に含まれており、それによって反応速度が増加するのではないかと考えているが、検証するに至らなかった。

10. 謝辞

この研究にあたり様々なアドバイスを下さった喜多村先生及び生物科の先生方、ありがとうございました。

今後、後輩が昆布に含まれる物質とその働きを解明してくれることを期待しています。

植物の成長と根の関係

尾崎拓 川口晃平 夏目和弥 宗像悟 山本将也 山本裕也

1. 緒言

私たちは街路樹の健康状態について興味を持ち、根の成長範囲の差が街路樹の成長度合いに影響していると考えた。そこでミニトマトをモデルにして様々な大きさの容器に植え、成長の度合いを観察した。その後、課題点を解決するために水耕栽培を行った。

2. 実験(1) (根を広げられる範囲と植物の高さの関係を調べる実験)

I. 実験手順

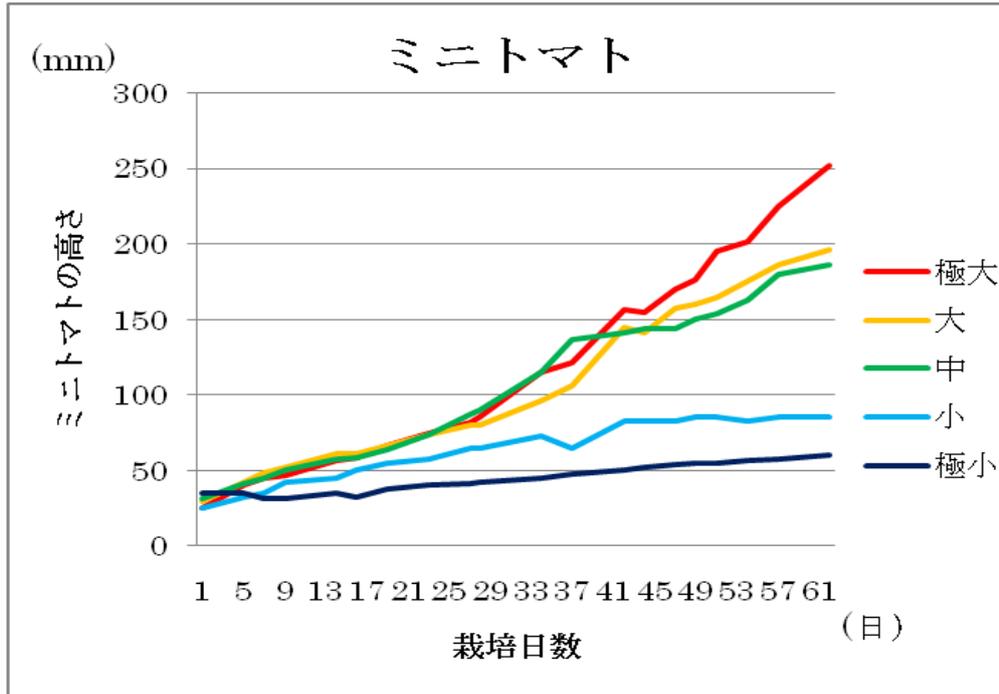
- ①高さ10cm 直径それぞれ8cm,6cm,4cm,2cm,1cmの鉢(左から、極大・大・中・小・極小とする)をクリアファイル(ポリプロピレン:厚さ0.20mm)を使用して各4個、合計20個作製した。
- ②作製した鉢それぞれの片側の底面をラップ(ポリエチレン)で覆い、セロハンテープで固定した。その後柄付き針を用い、水が十分に透過するまでラップに無数の穴をあけた。
- ③ミニトマトの種(タキイ種苗:千果)を市販の園芸用土(大創産業:バーク堆肥、まさ土、バーミキュライト、パーライト、有機石灰)を薄く敷いたタッパーに播き、発芽させた。
- ④鉢に高さ8cmまで園芸用土を入れ、発芽したミニトマトを植えかえた。
- ⑤ミニトマトは室温25℃の人口気象器(ケニス:LH-100RD(開放型))で1日に12時間光を照射した。水(蒸留水)は成長に十分な量を与えた。
- ⑥ミニトマトの高さ(土から最も高い葉の付け根まで)を1週間に3回定期的に記録した。



II. 結果

記録した結果で極大～極小それぞれの平均をとると下のグラフ①のようになった。

予想通り、(極大>大>中>小>極小)の順に高く成長した。極小では他と比較すると始めから成長が遅く、あまり伸びなかった。極大～小にかけては、始めは大きな差が見られなかったが、30～45日目辺りから顕著な差が見られた。



グラフ①

※極大は1つ、小は2つの個体が枯れたため、極大では3つ、小では2つ、その他では4つの個体の高さの平均をとった。

Ⅲ. 考察

根を広げられる範囲と植物の高さには関係があると考えられる。また、30～45日目頃から大きな差が見られたことから、この辺りから小・中・大のミニトマトが根を伸ばしにくくなり始めたとも考えられる。

しかし、実験(1)では栄養量を考慮に入れていなかったため、栄養量が容器の大きさに比例してしまっていた。そのため、植物の成長の差を引き起こす要因に根を広げられる範囲の差以外にも栄養量の差も考えられる。

そこで、実験(2)を行うことにした。

3. 実験(2) (実験(1)を発展させ、容器ごとの栄養量を均一にした実験)

I. 実験手順

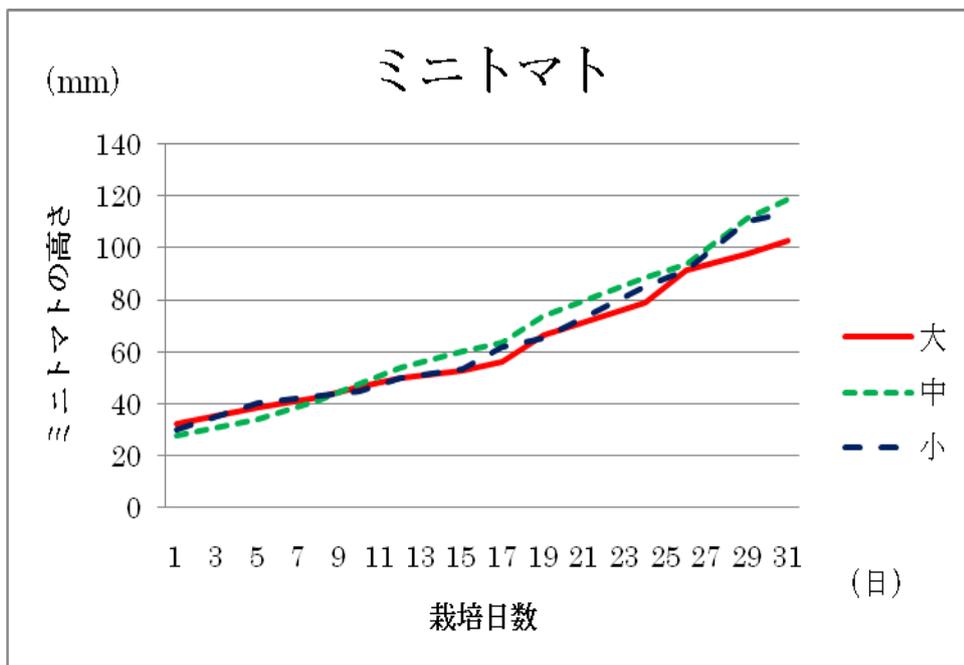
- ①プラスチック容器(ポリスチレン:縦 21cm 横 14cm 高さ 8cm) × 2 を容積が1:4:8の比(左から小、中、大とする)になるように板(ポリプロピレン)で仕切った。
- ②ミニトマトの種(タキイ種苗:千果)を市販の園芸用土(大創産業:バーク堆肥、まさ土、バーミキュライト、パーライト、有機石灰)を薄く敷いたタッパーに播き、発芽させた。
- ③発芽したミニトマト 12 個体を、小、中、大を4個体ずつとなるように①の容器に針金で吊りし、容器をタッパーに入れ根がつかるまで水道水を入れた。その際、あらかじめ、タッパーに 2000 倍に薄まるように水で溶いた肥料(ハイポネックスジャパン、微粉ハイポネックス(ハイポネックス複合肥料)、窒素:リン酸:カリ=6.5:6:19)を適量入れておいた。
- ④ミニトマトは室温 25℃の人口気象器(ケニス:LH-100RD(開放型))で1日に24時間光を照射した。

⑤1週間に2回水を変え、ミニトマトの高さ(根の付け根から最も高い葉の付け根まで)を1週間に3回定期的に記録した。



II. 結果

記録した結果で、大～小のそれぞれの平均をとると下のグラフ②のようになった。予想では、大>中>小の順に高く成長すると思われたが、区画の大小による高さの差が認められず、期待していた結果を得ることができなかった。



グラフ②

※小は1つの個体が枯れたため、小では3つ、その他では4つの個体の高さの平均をとった。

ウツボカズラ ~*Nepentes sp.*~の消化酵素

河本早紀 西野真祐 平尾優佳 堀伽名

1. 緒言

私たちは、先輩のサイエンス探求最終報告書を読み、食虫植物について知った。本来、虫や動物に植物に食べられるはずの植物が、逆に虫を捕食するという点に興味を持ち、食虫植物の中でもウツボカズラ (*Nepentes sp.*) について研究した。そして、その性質を生かして日常生活に応用するために、その初段階として酵素の持つ性質について調べた。

研究するにあたって、咲くやこの花館からウツボカズラを一株、学校から二株いただき、実際に学校のガラスケースで育てた。ウツボカズラは熱帯に生育する植物なので、環境を整えることが難しく、苦労した。休日も学校へ行き、毎日水やりをした。長い休みには、分担してウツボカズラを家に持って帰り世話をした。慣れない部分も多々あり、辛いと感じることもあったが、日々成長していくウツボカズラの姿を見ているととても嬉しい気持ちになった。さらに、捕虫囊ができる過程という貴重なものも観察することができた。実際に育ててみることで、ウツボカズラへの理解、関心が深まった。



自宅で養生中のウツボカズラ

2. 方法・結果・考察

行った実験は次の6つで、まず、pHが近いウツボカズラの消化液とレモン果汁がタンパク質に作用するのに違いが出るかを調べ、これを**実験①**とした。次に、**実験②**として、酵素の働きが強いと言われるキウイフルーツ、パイナップル、イチゴを用いてどの酵素が最もタンパク質に作用するのかを実験した。続いて、ウツボカズラの酵素の最適温度、最適pH、それぞれ**実験③**、**実験④**とした。そして、酵素のタンパク質に対する働きを強める方法はあるのか、またその方法を調べ、これを**実験⑤**とした。最後に、**実験⑥**として、実際にアリを溶かしてみた。

実験①

pHが近いウツボカズラの消化液とレモン果汁がタンパク質に作用するのに違いが出るか調べた。

- ①市販のゼラチンパウダー5gと水250mlを用いてゼラチン培地を作った。
- ②4mlの消化液(pH2.5)、レモン果汁(pH2.2)を培地に滴下した。
- ③反応が見られるまで室温で放置した。

実験①の結果と考察

滴下後 4 日 レモン果汁の培地には培地に変化が見られなかった。消化液は培地が液化していた。

滴下後 10 日 レモン果汁の培地にはカビが多く発生していた。消化液は目立ったカビは見られなかった。

これらより消化液にはタンパク質にはたらく酵素が含まれることがわかった。また、抗菌作用もあるのではないかと考えた。



レモン果汁

消化液

実験②

レモン果汁のほかにも酵素の強いキウイフルーツ、パイナップル、イチゴを用いて実験した。

- ①それぞれの果汁を 2ml 用意した。
- ②タンパク質試料(アルブミン 20mg+蒸留水 2ml)に緩衝液(pH5.0) 1 ml 加えた。
- ③①と②を合わせて 30°Cの環境で 5 分間放置した。
- ④トリクロロ酢酸溶液(0.2ml)を加えて反応を止めた。
- ⑤反応溶液(10ml)を用いてビウレット反応を行った。
- ⑥溶液をろ過し、吸光度を測定した。

*分光光度計について

分光光度計とは、試料に光を当てその透過した光の値を(吸光度)を計測し数値化することができる装置のことである。今回はビウレット反応で着色した試料で、反応後の目視では判断できない色の差を見るために用いた。

*ブランクについて

ブランクとは試料を蒸留水に変えて上記の手順通りに行った後の吸光度のことである。これが基準の数値となる。つまり表のブランクとの差が大きいほど酵素がよくタンパク質に作用したことを示している。



分光光度計

実験②の結果と考察

試料	ウツボカズラ	パイナップル	キウイ	イチゴ
ブランクとの差の平均	0.809	0.566	0.303	0.209

実験②より、最も強い酵素はウツボカズラの消化酵素によるものと分かった。

実験③

消化液が最もはたらく最適な温度を調べた。

- ①ゼラチン培地を用意した。
- ②消化液 (pH5.4) を培地にたらし、それぞれの培地を 10℃、20℃、30℃、40℃、50℃の環境下においた。
- ③反応が見られるまで放置した。

実験③の結果と考察

時間/温度	10℃	20℃	30℃	40℃	50℃
3時間	固まった	固まった	少しゆるく固まった	ゆるく固まった	固まった
2日後	溶けた	溶けた 白く薄い膜の片がみられた	溶けた 白く薄い膜がみられた	溶けた	固まった

実験③より酵素の最適温度は、40℃付近であることが分かった。

実験④

最適 pH を調べた。

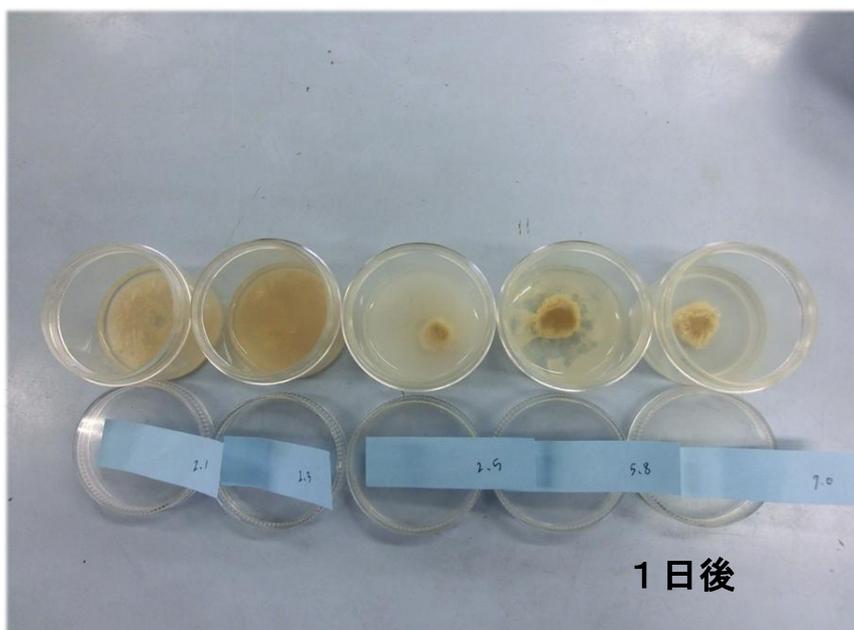
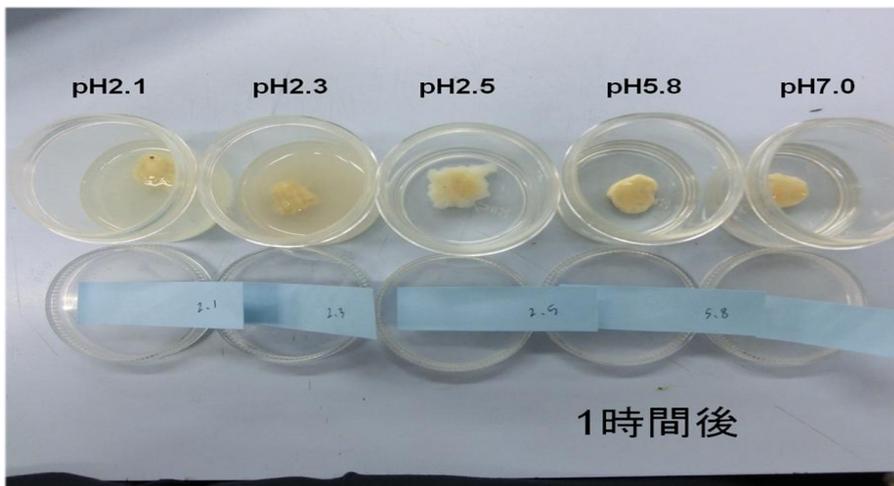
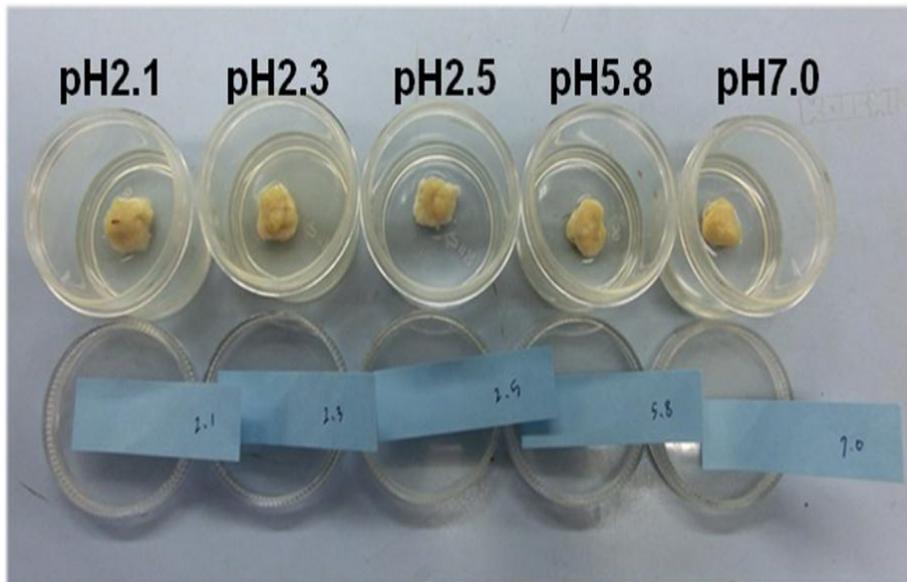
- ①消化液 5ml (pH2.1、2.3、2.5、5.8、7.0) と
- ②グルテン 0.5g を 40℃で放置した。
- ③1時間後、1日後に観察を行った。

尚、グルテンは水 58ml と強力粉 100g を練って作った。



グルテン

実験④の結果と考察



pH	2.1	2.3	2.5	5.8	7.0
消化液	白濁	白濁	少し白濁	変化なし	変化なし
感触	柔らかい	柔らかい	少し柔らかい	少し柔らかい	少し柔らかい
におい	あり	あり	あり	なし	なし
グルテン	溶けた	溶けた	少し溶けた	溶けなかった	溶けなかった

実験④より最適な pH は 2 前半にあることが分かった。

実験⑤

水分を蒸発させ濃縮することによって酵素の働きに変化が出るかを調べた。

①そのまま何もしないパイナップル果汁 (A) と、半分水を蒸発させたパイナップル果汁 (B) を用意した。

②**実験②**と同様に、ビウレット反応を行った。

実験⑤の結果と考察

酵素	そのままの酵素(A)	濃縮した酵素(B)
ブランクとの差の平均	0.107	0.1632

実験⑤より大きな差は見られなかったが、若干、濃縮した酵素の方がよくタンパク質を分解した。

実験⑥

アリを溶かして変化を観察した。

① 4 ml の消化液と水に 5 匹のアリを入れ、常温で放置した。

② 数日ごとに pH の測定と観察を行った。

実験⑥の結果と考察

水：pHは多少変化した。アリ自体に変化はなかったが、1週間後、アリのまわりに水カビと思われる白いもやもやが、54日後には苔のような緑のもやもやが見られた。

消化液：pHの変化はなかった。1週間後、アリが黒色から茶色に変化した。1ヶ月後、胴体から足が取れた。水の方で見られたもやもやはなかった。

アリはどちらも予想していたようにバラバラには溶けなかった。

前回の実験で見られたように、ここでも消化液の抗菌作用が見られた。



1日目

22日目

54日目

3. 結論

- ・タンパク質にはたらく酵素が含まれていた
- ・抗菌作用がある
- ・強い酵素を持つ
- ・最適温度は40℃前後
- ・最適pHはpH2 前半
- ・濃縮することで働きを強めることができた

4. 参考文献

岡山大学農学部研究報告書 vol. 92, 53-56 (2003)

肉を溶かす酵素のはたらき ～パイナップルのタンパク質分解酵素を調べる～

5. 謝辞

私たちが研究を進めるにあたって、多くの方々のお力添えを頂きました。消化液や食虫植物についての知識や資料を提供して頂いた大阪市立咲くやこの花館のスタッフの皆様、施設の温室内を案内して下さった安田卓宏様、ウツボカズラを一株頂き、本来熱帯に生育しているウツボカズラを日本で育てるにあたって越冬の際に温度を保つアイデアを提案して下さった久山敦様、貴重なお時間を割いていただきありがとうございました。また、実験を進める上で様々なサポートをしていただいた高木三和子先生、ならびに生物科の先生方、化学科の國津宗幸先生、最後に、一年半多くのご指導をいただいた中根将行先生に大変感謝申し上げます。