



ホースラディッシュを用いたペルオキシダーゼの酵素反応の測定

南渉平¹、上村忠直¹、下村陽信² (奈良県立桜井高等学校、¹生徒、²教員)

1. 序論

▽研究の背景△

生物の授業内で、酵素反応における酵素と生成物の関係について学んだ。実際にそうなるのか測定してみたいと思ったが、簡易に行う手法が見当たらなかった。

文献を探したところ、ペルオキシダーゼという酵素による過酸化水素とABTSの酵素反応により、溶液が無色透明から青緑色に変わる反応が見られることが分かった⁽¹⁾。この反応は視認性が高く、吸光度計を用いることで酵素反応における時間と生成物の関係が測定できるのではないかと思い、本研究を開始した。

▽研究の目的△

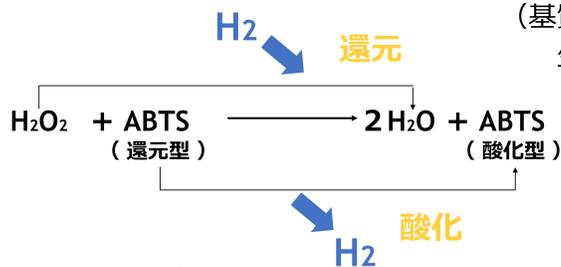
授業で学習した通り、時間の経過とともに酵素の反応速度は鈍くなっていくのか、また反応が起きる物質の濃度を変えた場合における酵素の反応はどのようなものかを測定する。

2. 各種物質の説明

▽ペルオキシダーゼとは△

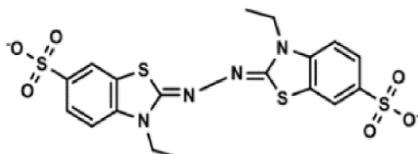
酸化還元酵素

(基質からH₂を奪い、生物にとって毒性の高いH₂O₂をH₂Oに還元)



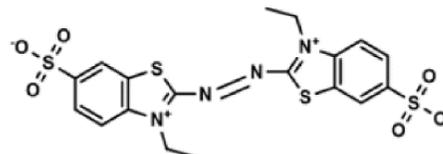
▽ABTSとは△

ABTS(還元型)



<無色>

ABTS(酸化型)



<青緑色>

本実験では上記における反応をすすめることで、生成物である酸化型ABTS量が増加し、呈色反応が進む。その様子を吸光度計を用いて測定した。



※酵素液を作成する際に使用したホースラディッシュ



※反応後のABTS

3. 実験方法

実験方法

- 市販のホースラディッシュ1.0gに精製水20mLを加え、酵素液を作成する。
- それぞれの試験管に各濃度の過酸化水素水と、1mmol/L ABTS溶液を1mLずつ入れる
- 酵素液の上澄みを試験管に加え、攪拌する。
- 吸光度計(ヤマト科学 PiCOEXPLORER)で15秒おきに測定する。

◆実験①

3%過酸化水素水とABTS溶液に、500μLの酵素液と、100μLの酵素液+400μLの精製水をそれぞれ加え、酵素濃度の違いによる吸光度の変化を調べた。

◆実験②

3%過酸化水素水を100、75、50、25、10、5、1(希釈なし)倍に希釈し、それぞれにABTS溶液と500μLの酵素液を加え、過酸化水素水の濃度の違いによる吸光度の変化を調べた。

ヤマト科学
PiCOEXPLORER→



4. 結果

◆実験①

両方とも30秒経過時点では反応速度は緩やかであったが、45秒経過時点で15秒間の増加量が著しく大きくなった。(図①)また、酵素液100μLに精製水400μL加えたものに比べて、500μLの酵素液は0秒~60秒経過にかけての吸光度の増加量が約5倍、吸光度の最大値は約3倍になっていた。

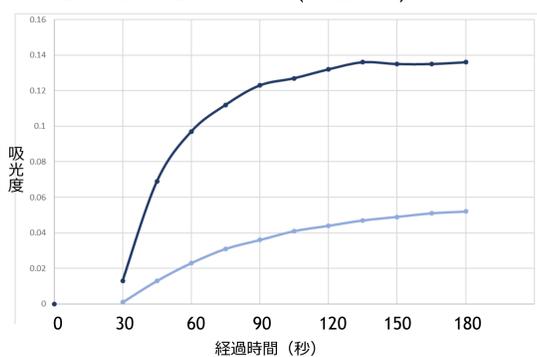
酵素量の違いによって吸光度の増加量や最大値に違いが生まれた。文献2によると、過酸化水素水の影響で酵素活性が下がるという結果があったため、過酸化水素水の濃度の違いによっても酵素の活性に違いが生まれるのではないかと考え、実験②を行った。

◆実験②

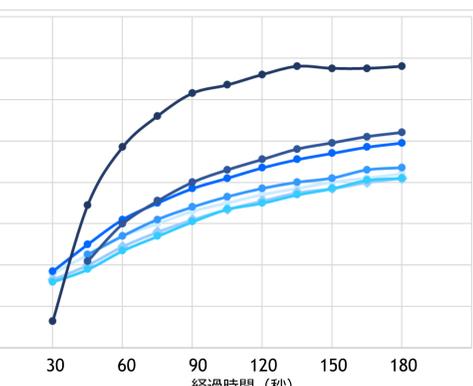
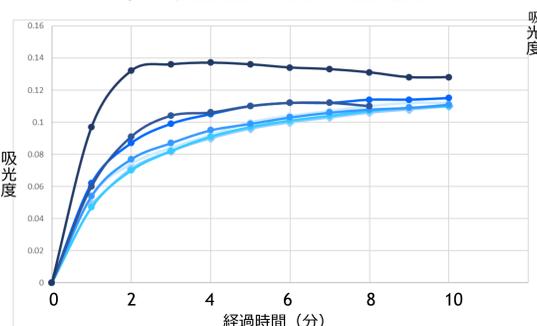
得られた吸光度を30秒経過時点から15秒おきに3分間測定した結果を図②-1に、1分ごとに10分間測定した結果を図②-2に示す。

希釈なし過酸化水素水を使用した実験では、グラフは滑らかな曲線にならず、ほかのものに比べて0~30秒間の吸光度の増加量が小さい一方で30秒以降の増加量が著しく大きくなった。(図②-1)

過酸化水素水の濃度が高いほど、3分経過時点での吸光度の最大値が高くなっていった。また、10分経過時点では、過酸化水素水の濃度に関わらず、一定の吸光度に収まろうとしていることが分かった。(図②-2)



図①：酵素濃度を変えたときの吸光度の変化



図②-1：初速度でみた過酸化水素各濃度の吸光度の変化

図②-2：過酸化水素各濃度の吸光度の変化

5. 考察と展望

◆実験①

今回の実験手法にて、酵素濃度を1/5にすることで、0~1分間の吸光度の増加量(反応速度)が理論通り、約1/5になることを確かめることができた。

また、両方とも30秒経過時点より、30~45秒の15秒間の方が増加量が大きいのは、30秒経過するまでにおいて過酸化水素水の濃度の影響で酵素活性が抑えられたためと考えられる。一方で、30~45秒の反応速度や吸光度は最大の値となり、文献2とは異なる結果となった。本研究においては、3%過酸化水素水においても、活性が失われなかったと考えられる。

◆実験②

過酸化水素水の濃度の違いに関わらず、時間が経過するとほぼ一定の吸光度に収まろうとしていた。このことから、吸光度の最大値はABTSに依存しているということが考えられる。また、本実験では、大きな誤差なく酵素反応の測定実験を行うことが出来たといえる。初速度で見ると過酸化水素水の濃度が低い方が反応速度は速くなっているが、30秒以降では濃度の高い方が反応速度は速いので、文献2のように過酸化水素水の濃度が3%程度であっても、反応速度が著しく低下するというのは一概にはいえないと考えられる。

今後の展望として、酵素量や過酸化水素水の濃度の違いのほかに、温度やpHの違いによる酵素反応の変化について研究していきたいと思う。

謝辞

本研究を行うに当たり、摂南大学理工学部 西矢芳昭教授には多くのご助言をいただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 佐々本康平(2019) 酵素特性を理解するための実験法の開発と高校生物教育への実践 摂南大学融合科学研究所論文集
- 松林真奈美(2015) ペルオキシダーゼによる退色反応の過酸化水素に対する耐性 SEN'I GAKKAISHI Vol.71