

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

奈良県立桜井高等学校 科学部生物班 上村忠直 南渉平

【キーワード】 酵素反応、吸光度測定、反応速度、過酸化水素、ペルオキシダーゼ

1. はじめに

生物の授業内で、酵素反応における酵素と生成物量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量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。

2. 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になるのかを測定する。

3. 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、500 μ L の酵素液と、100 μ L の酵素液+400 μ L 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 500 μ L 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。

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 100 μ L に精製水 400 μ L 加えたものに比べて、500 μ L 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。

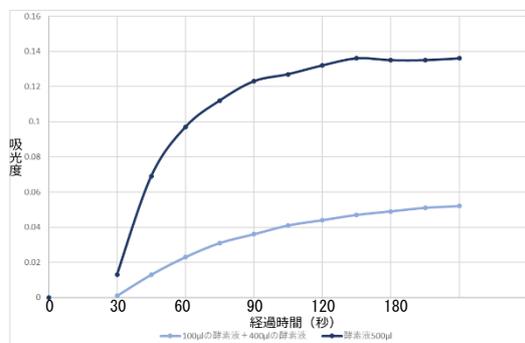
酵素量の違いによって吸光度の増加量や最大値に違いが生まれた。文献 2 によると、過酸化水素水の影響で酵素活性が下がるという結果があったため、過酸化水素水の濃度の違いによっても酵素の活性に違いが生まれるのではないかと思い、実験②を行った。

◆実験②

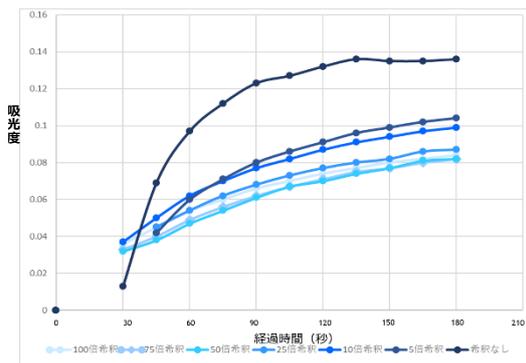
得られた吸光度を 30 秒経過時点から 15 秒おきに 3 分間測定した結果を図②-1 に、1 分ごとに 10 分間測定した結果を図②-2 に示す。

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、ほかのものと比べて 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）

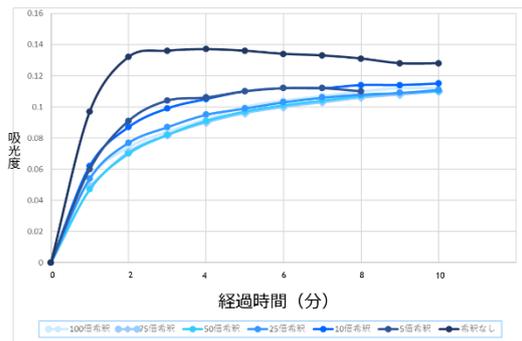
過酸化水素水の濃度が高いほど、3 分経過時点での吸光度の最大値が高くなっていった。また、10 分経過時点では、過酸化水素水の濃度に関わらず、一定の吸光度に収まろうとしていることが分かった。（図②-2）



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

4. 考察

◆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、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。

5. まとめ

本研究において、時間と生成物量の関係のグラフを理論通りに得る条件を見つけることができた。また、酵素量の違いによって、酵素反応の速度に違いが出ることで、3% 過酸化水素水を 5 倍以上希釈することで、濃度のちがいによって吸光度の最大値に影響が出ないことがわかった。

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。

引用文献

- (1) 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
- (2) 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