

第1学年特別進学クラス 学校設定科目

# SS 工学技術基礎

3分野（バイオ系）

《後期》

2023年度版

	実習項目	実習日	レポート 提出日	検印	備考
C-6	アミラーゼの酵素反応実験				
C-7	クロマトグラフィーによる植物色素の分離と光				

担当：佐藤龍平



1年 組 番 氏 名



## C-6 アミラーゼの酵素反応実験

### 1. 目的

- (1) 微生物が合成する酵素について、基礎的な知識を身につける。
- (2) アミラーゼの反応速度を調べる実験を通して、結果について論理的に考察する力を養う。
- (3) 生化学的実験に興味を持ち、幅広く情報を集めるなどして主体的に学習に取り組む態度を養う。

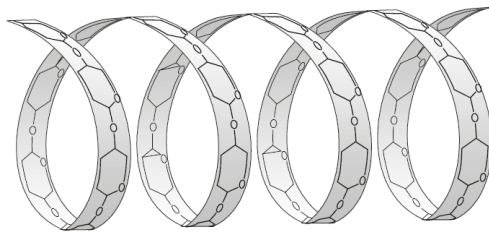
### 2. 実験に必要な基礎知識

#### ■ 酵素(英語: \_\_\_\_\_)について

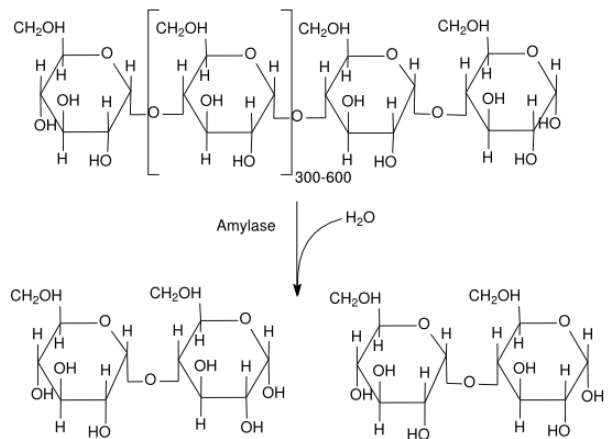
生物がつくり出す触媒作用をもつタンパク質を「酵素」という。

・酵素の例を挙げ、基質と生成物を記せ。 生物図説p50参照

酵素名	基質	生成物質
アミラーゼ		



デンプンの分子構造



アミラーゼによるデンプンの加水分解

#### Q. 触媒とはなんだろう？

⇒化学反応が起きる際の反応速度を速め、なおかつ自分自身は反応の前後で変化しない物質

- 触媒 (catalyst) ・ \_\_\_\_\_ 触媒: 触媒としてはたらく無機物。金属、酸化物、錯体など。  
 ・ \_\_\_\_\_ 触媒: 生体内ではたらく触媒。生物の代謝を担う。酵素のこと。

#### Q. 触媒は何をしているのか？

⇒触媒は化学反応が進行するのに必要な \_\_\_\_\_ エネルギーを下げるはたらきをもつ。

※化学反応が進行するためには、物質はエネルギーの高い状態(活性化状態)になる必要がある。この状態になるために必要なエネルギーを活性化エネルギーという。

例えばデンプンを化学的に分解するには、強酸性下、高温で行わなければならないが(芋を長時間ゆでも砂糖にはならない)、この反応をアミラーゼが触媒すると中性、常温で容易に分解できる。

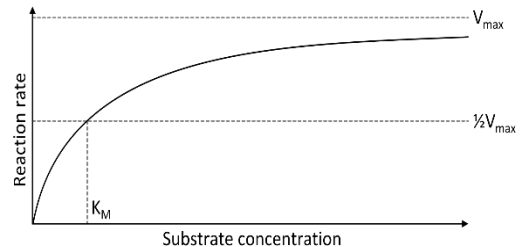
## ■ 酵素反応の特徴

- (1)酵素は特定の基質(作用する物質)のみに働き、特定の生成物質を生じる。⇒ \_\_\_\_\_ 性
- (2)その酵素が最も反応しやすい(最適)条件がある。⇒ 最適濃度、最適温度、最適pH
- (3)高温や強酸・強塩基性で酵素活性が失われる。⇒ \_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_
- (4)特殊な物質の存在で触媒作用が阻害・破壊される。

## ■ 酵素の反応速度 生物図説p.48参照

酵素反応では、基質が酵素と衝突して「酵素-基質複合体」が形成される頻度が高いほど、反応速度は( 高く or 低く )なる。

また、分子の運動は温度が高いほど活発になるので、一般的に、温度が高いほど反応速度は( 上昇 or 減少 )する。



基質濃度と反応速度

## ■ ヨウ素デンプン反応 indo-starch reaction

デンプンの希薄溶液にヨウ素液(I-KI溶液)を作用させたとき青紫色を呈する反応。きわめて鋭敏な呈色反応で、微量のヨウ素orデンプンの検出に用いられる。(小学館)

アミロースでは青色(吸収極大波長650nm)、アミロペクチンでは赤紫色(吸収極大540nm)、グリコーゲンでは赤褐色(吸収極大460~470nm)を呈する。(今堀和友・山川民夫監修:生化学辞典第3版、東京化学同人、1998)

## ■ アルコール発酵

アルコール発酵とは、グルコース、フルクトース、スクロースなどの糖を細胞のエネルギーに変換し、副産物としてエタノールと二酸化炭素を生産する生物学的プロセスである。反応に酸素を必要としない嫌氣的反応である。酵母はアルコール発酵を行う単細胞性の菌類で、アルコール飲料、みそ、しょうゆなどの発酵食品の製造に欠かせない。



### 3 実験方法

#### I. 酵素活性におよぼす温度の影響

【操作1】40°C・50°C・60°C・70°Cの恒温水槽を用意する。

【操作2】ヨウ素ヨウ化カリウム溶液\*を点滴板上に2滴程度ずつ滴下する。

(※ヨウ素ヨウ化カリウム溶液:約4gのKIを少量の水に溶かし、ヨウ素1.06gを加えて100mLとする。この液1mLを使用直前に1mol-HCl 8.3mLを加えて水で250mLとする)

【操作3】

①試験管Ⅰ、試験管Ⅱに以下の試薬を入れ、恒温水槽に入れる。

・試験管Ⅰ(基質液):1%可溶性デンプン溶液 4mL

・試験管Ⅱ(酵素液):0.5%アミラーゼ懸濁液 10mL

②試験管Ⅱの酵素液1mLを試験管Ⅰの基質液に加えてよく混ぜ、恒温水槽に入れて時間を計測し始める。

【操作4】

酵素液を加えて1分毎に、1mL駒込ピペットで試験管Ⅰから反応液を採取し、点滴板上のヨウ素液に1滴加え、その時の色を記録する。アミラーゼの働きでデンプンが加水分解され、ヨウ素デンプン反応による青紫色は時間とともに消える。色が消えた時間を記録する。

【+α】ヨウ素液の色の変化を「ヨウ素の明るさを測定するプログラム」で測定する。

①反応液を加えたヨウ素液の写真をiPadで撮影する。

②反応時間ごとに画像をトリミングし、「1.JPG」「2.JPG」のように通し番号の名前をつけてGoogle Driveにアップロードする。

③プログラムを実行し、ヨウ素液の輝度を測定・表示する。

#### II. 基質濃度と反応速度の関係

【操作1】55°Cの恒温水槽を用意する。

【操作2】

①4本の試験管に4mLの可溶性デンプン溶液(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%)を入れ、恒温水槽に入れる。

②0.5%アミラーゼ懸濁液を駒込ピペットで1mL加えてよく混ぜ、時間を計測し始める。

以降の操作は「I. 酵素活性におよぼす温度の影響」と同様。

#### III. 酵母によるアルコール発酵

【操作1】2本のキューネ発酵管を以下のように用意する。

・キューネ発酵管Ⅰ:ドライイースト1gを加えた10%グルコース溶液(室温用)

・キューネ発酵管Ⅱ:ドライイースト1gを加えた10%グルコース溶液(40°C用)

【操作3】十分に時間が経過した後、気体発生量を比較する。

#### 4 仮説と結果

##### I. 【酵素活性におよぼす温度の影響】

仮説: \_\_\_\_\_

結果: ※「色」の欄に肉眼で観察した色を、「輝度」の欄にプログラムで検出した輝度データを記入する。

	40 °C		50 °C		60 °C		70 °C	
	色	輝度	色	輝度	色	輝度	色	輝度
0分								
1分								
2分								
3分								
4分								
5分								
6分								
7分								
8分								
9分								
10分								
11分								
12分								
13分								
14分								
15分								
色が消えた 時間(分)								
反応速度 (g/分)								

[実験ノート]

日付:

室温:

実験中に気付いたこと:

.....

.....

.....

.....

実験後:(わかったこと、予想と違ったことなど)

.....

.....

.....

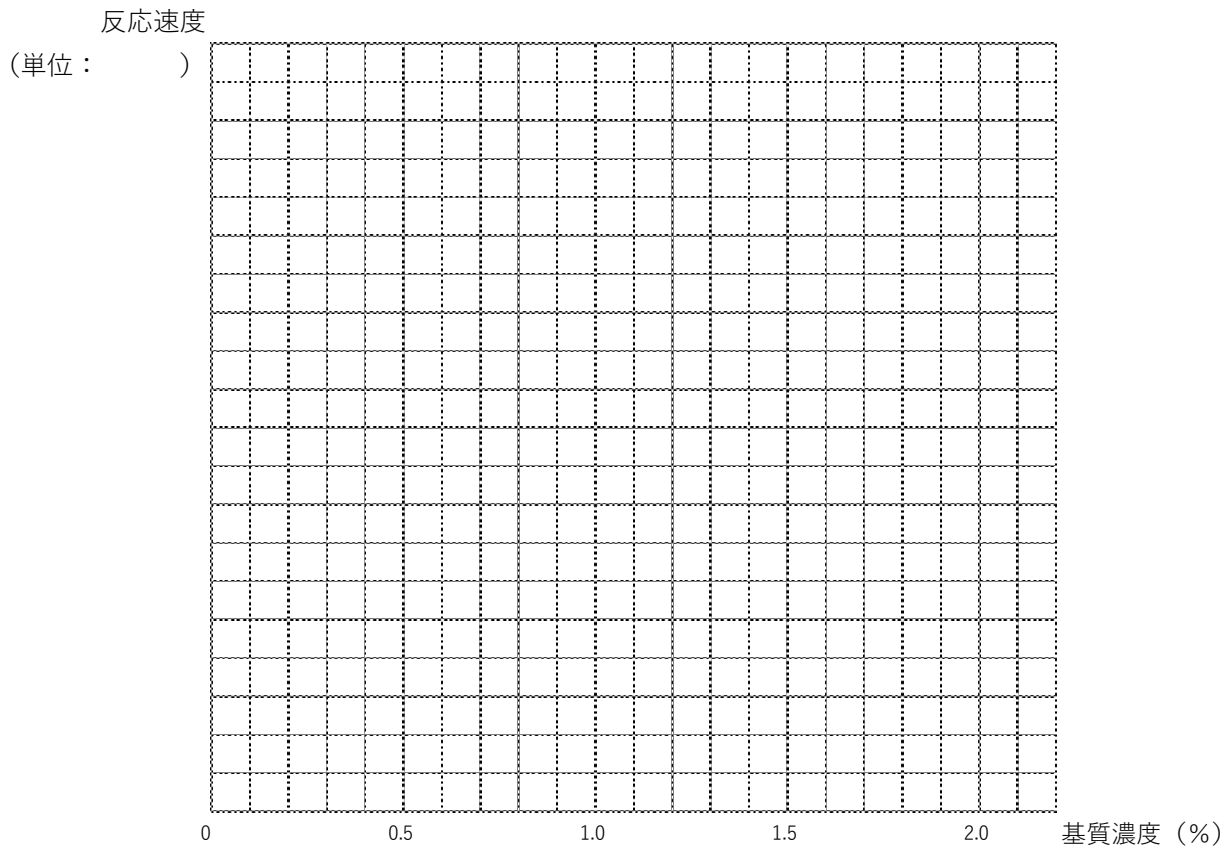
II. 【基質濃度と反応速度の関係】

仮説: \_\_\_\_\_

結果:

	0.5 %	1.0 %	1.5 %	2.0 %
0分				
1分				
2分				
3分				
4分				
5分				
6分				
7分				
8分				
色が消えた時間 (min)				
反応速度(g/分)				

結果のグラフ化(II. 【基質濃度と反応速度の関係】の結果をグラフにする。)



III. 【酵母によるアルコール発酵】 室温 \_\_\_\_\_ °C

気体発生量 キューネ発酵管I: \_\_\_\_\_ ml

キューネ発酵管II: \_\_\_\_\_ ml

## 5. 考察課題

(1) 酵素活性と温度との関係について、実験から得られた反応速度の数値を参考に考察せよ。

---

---

---

---

---

(2) 酵素の反応速度と基質濃度の関係について、実験から得られた数値を参考に考察せよ。

---

---

---

---

---

(3) アルコール発酵について、実験 III のような結果になった理由を考察せよ。

---

---

---

---

---

(4) アルコール発酵によって本実験よりも効率よくエタノールを得るためにはどのような工夫が必要か。理由を明らかにして述べよ。

---

---

---

---

---

## 6. 科学技術系英文課題

次の英文を和訳しなさい。

[1] Enzymes are proteins that act as biological catalysts by accelerating chemical reactions.

---

---

[2] Fermentation is a metabolic process that produces chemical changes in organic substrates through the action of enzymes.

---

---

## 7. 参考文献等

---

---



## 8. 感想

---

---

---

---

---

---

## 9. 自己評価シート (アミラーゼの酵素反応実験)

評価項目	YES←	→NO	評価の根拠を具体的に記入
実習テーマに関する基礎的な知識・技能を身につけることができた。	4	3 2 1	
実験結果を科学的に考察し、学んだ知識を活用してレポートを作成することができた。	4	3 2 1	
テーマについて興味を持ち、最後まで諦めずに実習や課題に取り組むことができた。	4	3 2 1	

## C-7 クロマトグラフィーによる植物色素の分離と光

### 1. 目的

- (1) クロマトグラフィーの原理や吸光度法について、基礎的な知識を身につける。
- (2) 植物色素の定性分析を通して、結果について論理的に考察する力を養う。
- (3) 実験に興味を持ち、幅広く情報を集めるなどして主体的に学習に取り組む態度を養う。

### 2. 実験に必要な基礎知識

■ **物質の分離法**(separation method): 2つ以上の混合成分を含む試料を分析する場合に、各々の成分に分離する操作方法。

- ろ過(沔化、濾過)(filtration): 「ろ紙」などで、液体と固体の混合液を分離する方法。
- 再結晶(recrystallization): 溶質の溶解度が温度によって変化することを利用する方法。
- 抽出(extraction): 特定の物質を溶解度の差を利用して溶出・分離する方法。
- 昇華(sublimation): 固体から直接気体になる状態変化を利用する方法。
- 蒸溜(distillation): 沸点の違いにより物質を分離する方法。
- 濃縮(concentration): 溶液から、溶媒を蒸発させ溶質を取り出す方法。

※その他にも、いろいろな分離方法がある。

■ **クロマトグラフィー**(chromatography)

⇒物質の\_\_\_\_\_力の違いを利用して物質を分離する方法。

混合物中の各成分の**分離**や**単離**、**定性**や**定量**など多用途に活用できる。**固定相**の一端に試料を置き、それを**移動相**で流すと、各成分の固定相や移動相に対する**親和性**(吸着あるいは溶解)により、各成分の移動の速さに差が出てくる。その差を利用して個々の成分に分離する。

★ \_\_\_\_\_ **クロマトグラフィー**: ろ紙を用いて分離・分析する方法。ろ紙が固定相と支持体を兼ねる。展開液がろ紙にしみこんで移動するとき、試料が展開液とともに移動する。その移動のしやすさの違いによって物質を分離する。

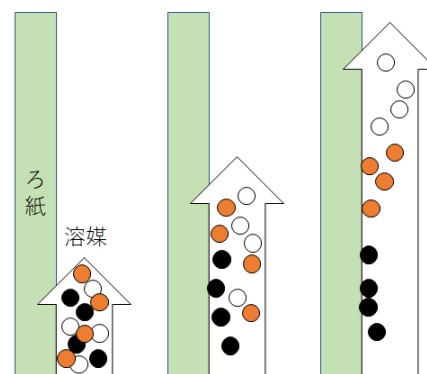


図1 ペーパークロマトグラフィー

★ **薄層クロマトグラフィー (TLC)**: ろ紙の代わりにガラス板にシリカゲル等の吸着剤を薄くコーティングしたものをを用いて分離する方法

★ **カラムクロマトグラフィー**: ガラス管にシリカゲルなどの吸着剤を詰め、上部から試料液および展開液を流すと試料液中の成分が吸着力の差により分離される。

★ **ガスクロマトグラフィー**: 気体の分析手法。気化しやすい化合物の同定・定量に用いられる。試料と移動相が気体であることが特徴である。

■ **R<sub>f</sub>値**(rate of flow)

移動率。溶液の移動距離に対する試料の移動距離の比のこと。ペーパークロマトグラフィーによる物質の同定は、**R<sub>f</sub>値**を求めることによって行われる。**R<sub>f</sub>値**は以下の式で求める。

$$R_f \text{ 値} = \frac{\text{原線から各物質の中心までの距離}(a_n)}{\text{原線から溶媒の先端までの距離}(r)} \quad \dots \text{ (式 1) } \quad \text{※この } R_f \text{ 値を標準物質と比較して同定を行う。}$$

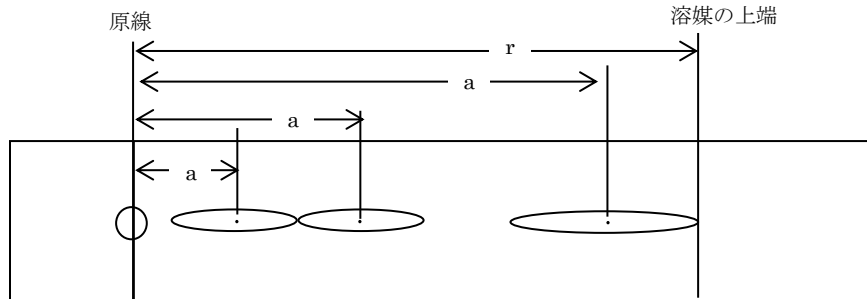


図2 ペーパークロマトグラフィーの**R<sub>f</sub>値**

**R<sub>f</sub>値**は固定相の種類、展開液、温度等の条件が一定ならば、一般的には再現性よく一定値を示す。そのため、この値及びスポットの形状や色から各成分の定性確認ができる。

表1 植物色素の**R<sub>f</sub>値**(15~22[°C])

溶媒	クロロフィルb	クロロフィルa	ビオラキサンチン	ルテイン	β-カロテン
	黄緑	青緑	黄	黄	橙黄
トルエン	0.22	0.39	0.69	0.85	0.95
ベンゼン	0.22	0.34	0.75	0.91	0.99
キシレン	0.23	0.38	0.70	0.84	0.97

■ **植物色素** (plant pigments)

植物色素には、フラボノイド、アントシアニンなどの花の色素、インジコ、アリザリンなどの染料の色素、植物の葉などに広く存在するクロロフィルなど多種多様な**有機化合物**が知られている。

■ **光合成色素** (photosynthetic pigment) 生物図説p52参照

光エネルギーを吸収して光合成のエネルギー源に変換する色素

		植 物	緑 藻	紅 藻	褐 藻	ケ イ 藻	細菌		
							シアノバ クテリア	光 合 成 細菌	
クロロフィル	クロロフィルa	○	○	○	○	○	○		
	クロロフィルb	○	○						
	クロロフィルc				○	○			
	バクテリオクロロフィル							○	
カロテノイド	カロテン(βカロテン)	○	○	○	○	○	○		
	キサント フィル	ルテイン	○	○	○				
		フコキサンチン				○	○		
フィコビルリン	フィコシアニン			○			○		
	フィコエリトリン			○			○		

■ 光 (light ray)

ラジオ、テレビの電波やレントゲンに使われるX線と同じ電磁波の一種。表2に示されている用に、波長が10 [nm※] ~ 380 [nm] の範囲を紫外(UV; ultra violet)、380 [nm] ~ 780 [nm] の範囲を可視(VIS; Visible)、780 [nm] ~ 10<sup>4</sup> [m] 付近を赤外(IR; infra Red)と呼ぶ。ある物質に全部の波長を含んでいる光を当てると、物質はその中から好きな色だけを取り込んで離さなくなる。この現象を「吸収」という。その他の色が、その物質の色として見える色「補色」といい、私たちの目に「色」として見ることができる(表2)。

\*物質は特定の波長の光を吸収し、目に見える色はその補色である\*

表2 波長の種類と色(補色)の関係

名称	波長 λ	用途等	波長 [nm]	色	補色
超長波	10 <sup>4</sup> ~ 10 <sup>5</sup> [m] ~		610 ~ 780	赤	青緑
長波	10 <sup>3</sup> [m] ~ 10 <sup>4</sup> [m]	船舶・飛行機の通信機	595 ~ 610	橙	緑青
中波	10 <sup>2</sup> [m] ~ 10 <sup>3</sup> [m]	AM ラジオ	580 ~ 595	黄	青
短波	10 [m] ~ 10 <sup>2</sup> [m]	短波ラジオ	560 ~ 580	黄緑	紫
超短波	1 [m] ~ 10 [m]	FM ラジオ, アナログ TV	500 ~ 560	緑	赤紫
マイクロ波	0.01 [m] ~ 0.1 [m]	BS 放送	490 ~ 500	青緑	赤
マイクロ波	10 <sup>-4</sup> [m] ~ 10 <sup>-2</sup> [m]	レーダー	480 ~ 490	緑青	橙
赤外線	780 [nm] ~ 10 <sup>-4</sup> [m]	リモコン, 赤外線写真	435 ~ 480	青	黄
可視光線	380 ~ 780 [nm]		380 ~ 435	紫	黄緑
放射線	紫外線	10 ~ 380 [nm]	(『高等学校理科用 物理』より抜粋)		
	X線	0.001 ~ 10 [nm]	レントゲン		
	γ線	0.01 [nm] 以下	医療		

■ 紫外可視分光光度計

物質による可視・紫外線の吸収の強さは波長によってことなる。また、吸収スペクトル(吸収曲線)は物質に特有なものである。これによって物質を分析することを可視・紫外吸収スペクトル法(VIS・UV スペクトル法)という。単色光 I<sub>0</sub> が物質層を透過し強度 I になったとき、物質の吸光度 A は次式で表される。

$$A(\text{吸光度}) = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon c l \quad (\text{式 2})$$

試料は個体、気体についても測定されるが、一般的には溶液にして測定を行う。吸光度と溶液の濃度の間にはランバート-ベール(Lambert-Beer)の法則(式2)が成り立つ。 ※ランバート-ベールの法則:吸光度 A はモル吸光係数 ε、溶液の厚さ l、溶液のモル濃度 c に比例する。

表3 各成分の極大吸収波長

	クロロフィル b	クロロフィル a	ビオラキサンチン	ルテイン	β-カロテン
波長 [nm]	460 650	430 670	—	—	443 492

### 3. 実験方法

#### I. ペーパークロマトグラフィーによる色素の分離

##### 【操作1】展開液の準備

- ① 展開槽の底から 1cm 程度トルエンを入れる。管壁にトルエンが着かないようにする。
- ② ゴム栓を閉めトルエンの蒸気を展開槽に満たす。

##### 【操作2】色素の抽出

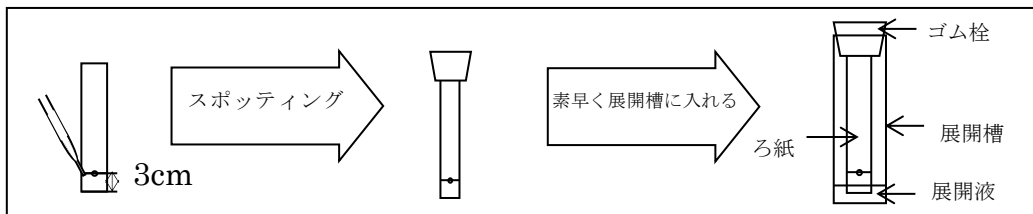
- ① 葉さじで茶葉1さじ分を乳鉢に入れ、乳棒ですり潰す。  
※植物の生きた葉などを試料にする場合、はさみで刻んでから乳棒ですり潰す。
- ② 駒込ピペットで抽出液(アセトン:メタノール=1:1)を 10ml 加え、再び乳棒ですり潰す。

##### 【操作3】スポットティング

- ① ペーパークロマトグラフィー用のろ紙の下から 3cm の所に鉛筆で線を引く(原線とする)。
- ② ガラスの毛細管を用いて、操作2-②の抽出液を原線の中央につける(原点とする)。
- ③ 乾いたら、さらに同じ所に抽出液をつける。これを数回繰り返す。

##### 【操作4】色素の展開

- ① 切り込みの入ったゴム栓に抽出液が染み込んだ(操作3-③)ろ紙を取り付け、操作1の展開槽にセットする。
- ② 溶媒が、ろ紙の 8 割程度まで上昇したら展開槽から取り出し、溶媒の位置を鉛筆で印をつける。その次に分離された植物色素の位置を鉛筆で印をつける。



##### 【操作5】Rf 値の測定

図2 ペーパークロマトグラフィー

- ① 取り出したろ紙を乾燥させ、それぞれの色素の Rf 値を測定する。

#### II. 分光器による植物色素の光の特性

##### 【操作6】遠心分離機による分離・分光器による観察

- ① 操作2で抽出した色素溶液を遠沈管に移し、遠心分離機にかける。(3,000rpm, 10min)
- ② 遠心分離機にかけている間に分光器を覗き、見えている色を記録する。
- ③ 遠心分離後の上澄み液 1ml を試験管に移して 5 倍に希釈し、その液を分光器にあて、吸収された色を観察・記録する。

#### III. 紫外可視分光光度計による色素の波長測定

##### 【操作7】波長測定

- ① 操作6-③で希釈した色素溶液をセルに移し、紫外可視分光光度計を用いて波長測定を行う。
- ② 測定した吸収スペクトルから各成分の極大吸収波長を記録する。

#### 4. 結果

##### I. ペーパークロマトグラフィー

基礎知識で示された計算式 1 によって Rf 値を計算し、植物色素(表 1)の同定を行う。

表 4 ペーパークロマトグラフィーの結果

(試料: \_\_\_\_\_ 固定相: \_\_\_\_\_ 展開液: \_\_\_\_\_ 気温: \_\_\_\_\_)

	色	原線からの距離	Rf 値	推定物質名(表 1)
溶媒の上端		r		
色素 A		a <sub>1</sub>		
色素 B		a <sub>2</sub>		
色素 C		a <sub>3</sub>		
色素 D		a <sub>4</sub>		
色素 E		a <sub>5</sub>		

実験中に気付いたこと:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

##### II. 分光器による測定

表 5 分光器の結果

分光器で見えた色	見えなくなった色 (○・△・×)*	吸収度		
		された	・	されない
		5	3	1
		5	3	1
		5	3	1
		5	3	1
		5	3	1
		5	3	1
		5	3	1
		5	3	1

(※見えなくなった色:○ 薄くなった:△ 見える色:×)

実験中に気付いたこと:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

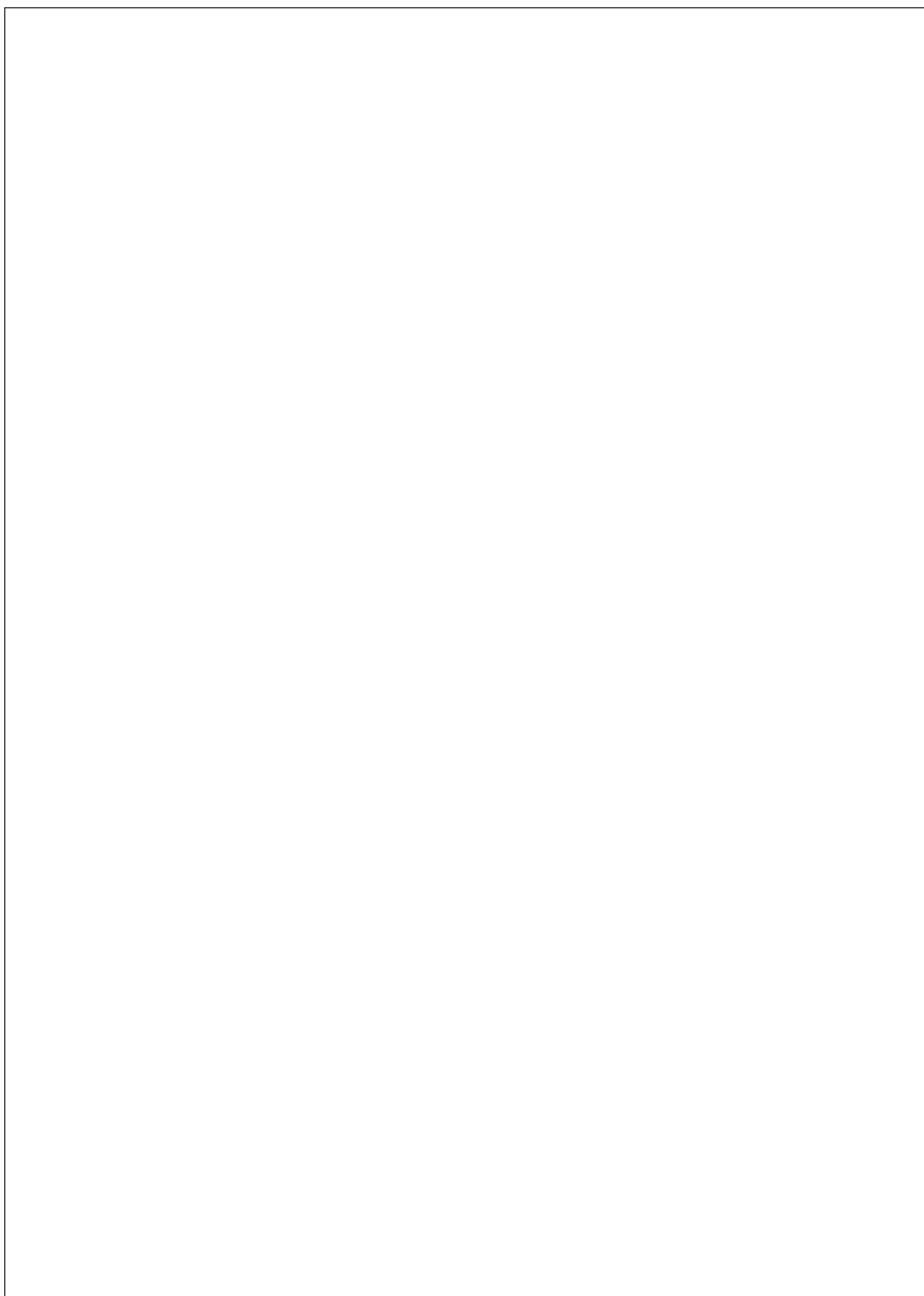
.....

.....

.....

.....

I. ペーパークロマトグラフィー・実験結果の添付  
ろ紙を添付し、それぞれの色素の名前を書き込む。

A large empty rectangular box with a thin black border, intended for students to attach their paper chromatography results and write the names of the pigments.

III. 紫外可視分光光度計による色素の波長測定・実験結果の添付  
プリントアウトした測定データを添付する。



## 5. 考察課題

(1) 実験 I (ペーパークロマトグラフィー) の結果からいえることは何か。

---

---

---

(2) 各色素の Rf 値を他の実験者と比較せよ。異なっていた場合、どのような理由が考えられるか。

---

---

---

(3) 実験 II (分光器) および実験 III (紫外可視分光光度計) の結果からいえることは何か。

---

---

---

(4) 植物の葉の多くが緑色なのはなぜか。「クロロフィル」、「吸収」という語を使って説明せよ。

---

---

---

(5) 深海の生物の多くが赤色なのはなぜか。

---

---

---

(6) 物質が光を吸収するということは、光のエネルギーが物質を構成する分子の振動などの別のエネルギーに変換されたことを意味する。大気中二酸化炭素濃度の増加が温暖化の原因となる理由を説明せよ。

---

---

---

## 6. 科学技術系英文課題

次の英文を和訳しなさい。

[1] Air is a mixture of nitrogen, oxygen, carbon dioxide, and other gases.

---

---

[2] Oxygen accounts for 21% of air and nitrogen accounts for 78% of air.

---

---

## 8. 参考文献等

---

---

## 9. 感想

---

---

---

---

---

---

## 10. 自己評価シート (クロマトグラフィーによる植物色素の分離と光)

評価項目	YES←	→NO	評価の根拠を具体的に記入
実習テーマに関する基礎的な知識・技能を身につけることができた。	4	3 2 1	
実験結果を科学的に考察し、学んだ知識を活用してレポートを作成することができた。	4	3 2 1	
テーマについて興味を持ち、最後まで諦めずに実習や課題に取り組むことができた。	4	3 2 1	





SS 工学技術基礎 2023

東京都立科学技術高等学校  
Tokyo Metropolitan High School of Science and Technology