

アルコール発酵実験装置の改良

An Improvement of Experimental Device for Alcohol Fermentation

井口 智文, 小北 景子*, 角屋 堯英

INOKUCHI Tomofumi, KOGITA Keiko and KAKUYA Takahide

In this study, new experimental device for alcohol fermentation was improved. It had structure that combined disposable syringe and seasoning bottle. Its production expense was lower than price of previous device. The use of this device was available to measure amount of generating gas and to confirm that generated gas was CO_2 , produce of alcohol and consumption of substrate (glucose) in one experiment. It was also possible to use this device for some experiments for alcohol fermentation, for example, experiments of examination of relationship between amount of produced CO_2 and reaction time, between reaction speed and reaction temperature, and between amount of produced CO_2 and some substrates.

はじめに

アルコール発酵は日本酒やパンなど古くから食品の製造に利用されている反応であり、高校生物の教科書では嫌気呼吸の代表例として挙げられている。その反応は酵母がグルコースをエタノールと二酸化炭素に分解するとともに2分子のATPを合成することと説明されている。また、多くの高校教科書にアルコール発酵の実験が記載されている^{1~3)}。これらの実験には主にキューネの発酵管を使用する例が記載されているが、キューネの発酵管は扱いにくい点がいくつかある。例えば、溶液の出し入れがやや難しく、発生した気体を取り出すことも困難で、一度の実験で確かめられることが限られてくる。器具の口が開いているために器具全体を温水中に浸けることが出来ず、反応温度を変えることも難しい。さらに、多くの比較実験を行なうためにはキューネの発酵管自身が多数必要であるが比較的高価である。そこで、最近の教科書や理科実験書などでは様々な改良が加えられたオリジナルの実験装置が紹介されている^{1, 2, 4, 5)}。

しかし、まだ改良の余地が残されていると考え、本研究ではキューネの発酵管に代わる、より簡単

* 平成13年度卒研究生（現所属：網野町役場）

で使いやすい新たな装置を製作することを目的とした。新たな実験装置のポイントとして、以下の5点を考慮した。1. 発生する気体量を測定できる。2. 発生した気体を回収することが容易である。3. アルコール生成の確認ができる。4. 基質である糖の消費を確認できる。5. 装置の材料は入手が簡単であり安価で簡単に作製でき、繰り返し使えるもの。さらに、開発した実験装置を用いてアルコール発酵の最適温度の検討と発酵に用いる基質の検討が行なえるかどうか併せて調べることにした。

材料および方法

材料

ドライイースト（スーパーカメリア；日清フーズ）を本研究に用いた。開封前は常温で保存し、また開封後は出来るだけ空気を抜いた状態にして冷蔵庫（約4℃）で保存した。

各溶液の作成方法

・石灰水

水酸化カルシウム（ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ）を蒸留水に飽和量溶かし、ろ過したものを使用した。

・ヨウ素液

100mlの蒸留水にヨウ化カリウム（KI）15gを溶かし、これにヨウ素（ I_2 ）6gを溶かして、有色瓶に移し保存した。

・ベネジクト液

硫酸銅（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）17.3g、クエン酸ナトリウム（ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）173g、無水炭酸ナトリウム（ Na_2CO_3 ）100gを水に溶かし1lにしたものを用いた。

実験装置と基本実験

本研究では図1に示すような実験装置を開発し用いた。実際の操作は、注射器に開けた穴をピンで塞ぎ、注射器内に水を入れておく。5%酵母液90mlと、5%スクロース液90mlを混ぜ合わせ調味料入れに注ぎ蓋をする。手早く注射器を調味料入れに取り付け、ピンをそっと外し、1分毎に気体発生の様子を観察し発生した気体の容量を注射器の目盛りから読みとる。注射器内が発生した気体で満たされたら、穴の部分に再びピンを刺して穴を塞ぎ、注射器に集められた気体を以下の実験に用いる。

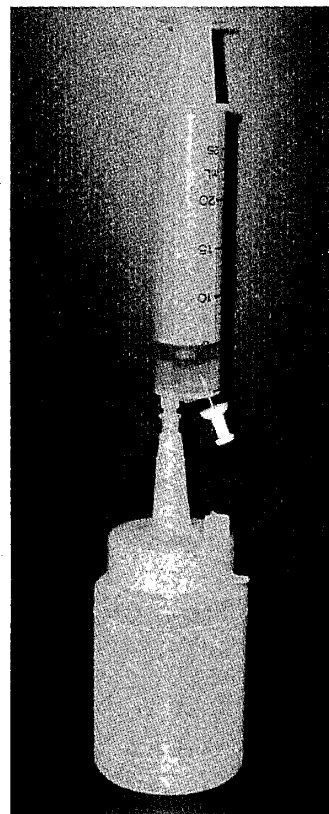


Fig.1 Experimental device improved in this study.

尚、基本実験の反応温度は37℃とした。

発生した気体が何であることを確かめる実験（石灰水および水酸化ナトリウムとの反応）

注射器の口にゴム管を取り付け、注射器中に溜まった気体を押し出してビーカーの石灰水に通し、石灰水の色の変化を観察した。

あるいは、気体の入った注射器に10%水酸化ナトリウム溶液を少量吸い込み、口の部分を粘土で塞いで注射器をよく振り、気体と溶液を良く混ぜ合わせた後、ピストン部分の動く様子を観察した。

アルコールが生成していることを確かめる実験（ヨードホルム反応）

実験終了後の混合液をろ過し、ろ液2mlを試験管にとる。そこに10%水酸化ナトリウム水溶液0.5mlを加えよく攪拌した後、ヨウ素液を薄く黄色に着色する程度に加え、約70℃の熱湯中で1～2分あたため、ヨードホルムの匂いと黄色沈殿（溶液の淡黄色への変化）の有無を確認した。対照として、混合液を調味料入れに注いだ直後に残った混合液を氷水に浸け冷やし、ろ過したろ液を用いた。

グルコースの消費を確かめる実験（ベネジクト液による反応）

5%酵母液90mlと、5%グルコース溶液90mlの混合液を準備し、37℃の反応温度で、一定時間ごとに混合液をよく攪拌して一部を取り、ろ紙でろ過し、ろ液を得る。試験管に各ろ液1mlを取りベネジクト液4mlを加えよく攪拌した。沸騰水中で2分間沸騰させ、手回し遠心器で遠心したあと、溶液の色の変化および沈殿の有無を確認した。対照として、混合液を調味料入れ容器に注いだ直後に残った混合液を氷水に浸け冷やし、ろ過したろ液を用いた。また、グルコース濃度の違いによる糖の消費を比較するため、2.5%グルコース溶液を用いて同様の実験を行った。気体発生と温度の関係5%酵母液90mlと、5%スクロース液90mlそれぞれを各実験温度にした後、混合し反応を開始した。各温度で気体発生量、およびアルコール生成の有無を比較した。反応温度は氷水中（3℃）、室温（約22℃）、37℃、45℃、50℃、55℃、60℃とし、37℃、45℃、50℃、55℃、60℃の実験は恒温槽（タイテック；サーモミンスターSD）を用い行った。

各基質と気体発生との関係

5%酵母液90mlと、グルコース（ $C_6H_{12}O_6$ ）、レブロース（ $C_6H_{12}O_6$ ）、ガラクトース（ $C_6H_{12}O_6$ ）、マルトース（ $C_{12}H_{22}O_{11}$ ）それぞれ5%溶液90mlを混ぜ合わせた反応溶液を用いて、37℃で基本実験を行い気体発生量、およびアルコール生成の有無を比較した。

結果と考察

注射器を用いた実験装置の開発

改良された実験方法⁴⁾を参考に様々な予備実験を進めると、発生した気体を集める部分と反応液を入れ気体を発生させる部分を別々にし、それらを組み合わせるという形状が扱いやすく、さらに、一度に幾つもの実験をすることを想定すると装置自体が自立可能であることがより便利な形であることが分った。そこで、ディスポーザブル注射器（テルモ、ニプロ）の口付近にピンを刺し、水抜き用の小さな穴を開けたものと100円ショップで購入した調味料入れと組み合わせた実験装置を開発した（図1）。上部と下部の接合部分にはディスポーザブル注射針から針部分を切り取った物を利用し、瞬間接着剤で調味料入れの先端部分に貼り付けた。注射針と注射器の接合部分は規格が統一されているため、必要に応じて注射器を交換することが出来、実験にあわせて注射器の容量を変えることにより気体の発生速度に合わせた細かい数値を測定することも可能であった。また調味料入れは口の広いものを選んだため混合液の出し入れも容易で、さらに混合液が入っている調味料入れ部分全体をお湯や氷水に浸けることができ、温度調節を容易に行なうことが可能であった。この実験装置を用いることにより反応時間と気体発生量のグラフを描くことができることも分った。さらに、注射器のピストンを使うと中の気体を簡単に外に押し出すことができるという利点もある。ただし、実験装置の構造上実験中は注射器内にあらかじめ入れてあった水が水抜き穴より漏れるため、トレイの上などで実験を行う必要がある。

発生した気体は何であるかを確かめる実験（石灰水および水酸化ナトリウムとの反応）

発生した気体が二酸化炭素であることを確かめるには石灰水を用いる方法と水酸化ナトリウムを用いる方法が一般的である^{1~3)}。石灰水に二酸化炭素を吹き込むと次のような反応が起こり、 $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ 生成した炭酸カルシウムが白い結晶となり析出し溶液が白濁し、二酸化炭素の存在が確かめられる⁶⁾。本装置では注射器を用いているため、先端部にチューブを繋げば、気体を石灰水に通すことが簡単に出来、実際に溶液が白濁する反応も確認できた。

二酸化炭素に水酸化ナトリウム溶液を少量加え攪拌すると次のような反応が起こり、 $2\text{NaOH} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ 可溶性の塩である炭酸ナトリウムが生成され、二酸化炭素の体積が減少する⁶⁾。キューネの発酵管では、発酵液に水酸化ナトリウム水溶液を加え、管口の部分を親指で押さえ指が吸い付けられることで二酸化炭素の減少を確認するが、本実験装置では気体を集めた注射器に水酸化ナトリウム水溶液を少量吸い上げ注射器の口の部分を粘土で塞ぎ気体とよく混ぜると、ピストン部分が引き込まれていく動きで注射器内の二酸化炭素の体積が減少する様子を視覚的に認識することが出来た。以上のように本実験装置を使うことにより、二つの方法で発生した気体が二酸化炭素であることを確かめる事が出来た。

アルコールが生成していることを確かめる実験（ヨードホルム反応）

反応により生成されたエタノールを確かめる実験としてヨードホルム反応を行った。その反応式は $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 4\text{I}_2 + 6\text{NaOH} \rightarrow \text{CHI}_3 + \text{HCOONa} + 5\text{NaI} + 5\text{H}_2\text{O}$ と、まとめられる⁶⁾。ヨードホルム (CHI_3) の存在は独特の刺激的な匂いで確認でき、エタノールの濃度が高い場合は匂いに加えてヨードホルムの黄色の結晶が析出する。室温 (22°C), 37°C, 45°C, 50°C, それぞれの反応温度で30分反応した後、混合液のろ液でヨードホルム反応を行なうと刺激的な匂いからエタノールの生成を確認することができた。しかし、結晶が認められたもの（溶液の淡黄色への変化）は、37°C, 45°Cでの反応の場合だけであった（図2）。

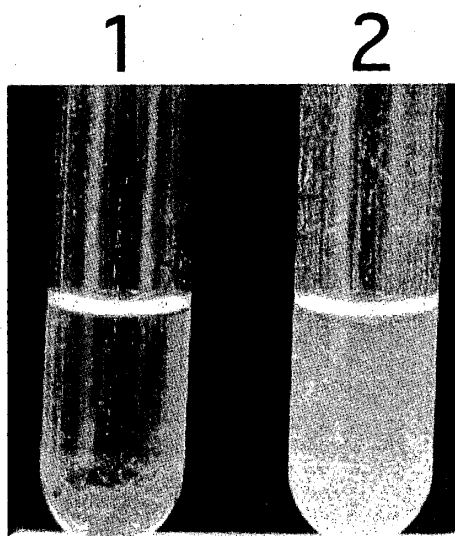


Fig.2 Generation of alcohol.

1 : 0min ; 2 : 30min (37°C)

一方、酵母液と基質液を混合した直後に氷水で冷やした混合液のろ液は匂いもなく、結晶も確認できなかった。以上のように本装置を用いるとアルコールが生成されていることを確かめることができる。

グルコースの消費を確かめる実験（ベネジクト液による反応）

本実験装置を用いると生成されるエタノールと二酸化炭素を確認することはできた。次に糖が消費されることを示せるかを調べた。糖の消費を調べるためにベネジクト反応を用いることにした。ベネジクト液による反応は次のように表すことが出来き、 $\text{RCHO} + 2\text{Cu}^{2+}$ （クエン酸錯塩） $+ 4\text{OH}^- \rightarrow \text{RCOOH} + \text{Cu}_2\text{O} + 2\text{H}_2\text{O}$ 、還元糖が存在すると酸化銅（I）の赤色沈殿が生じ青色であった溶液の色が消える⁷⁾。しかし、この反応は還元糖にしか用いることができないため、スクロースは利用できない^{6~8)}。基質の検討実験よりグルコースの利用が可能であることが確認出来た（後述）ので還元糖であるグルコースを用いることにした。反応開始後、一定時間で混合液を少量取り、ろ過した溶液を用いてベネジクト反応を行なうと、30分反応させた物には全く溶液の変化は見られなかった（図3）。

しかし、対象には茶褐色の沈殿が見られ、ベネジクト液の青色も消えていた（図3）。

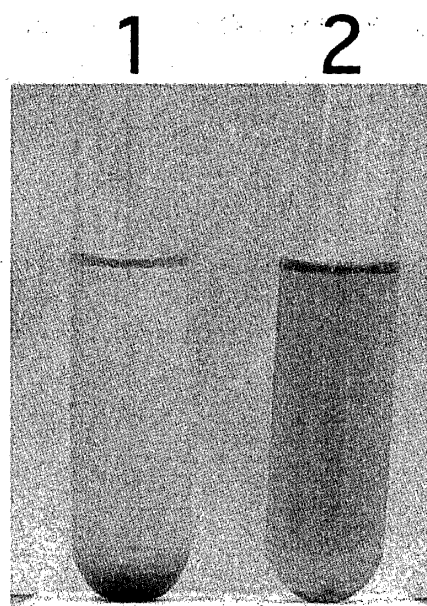


Fig.3 Consumption of glucose.

1 : 0min ; 2 : 30min (37°C)

この結果は、アルコール発酵が進むと混合液中の糖（グルコース）が消費されている事を示している。この様に本実験装置を用いると、糖が消費した様子を確認することが出来る。また、グルコース濃度を半分の2.5%で実験を行なうと、沈殿が生じなくなるまでの反応時間を約15分に短縮することができた。

気体発生量と温度の関係

次に、気体発生量と温度の関係についてスクロース溶液を基質として実験を行った。氷水中（約3℃）、室温（約22℃）、最適温度付近とされている37℃、45℃、50℃、55℃、60℃で行なうと図4 Aのグラフを描くことができた。グラフを見ると氷水中、55℃、60℃では気体の発生が見られず、37℃、45℃、50℃を比べると37℃、45℃と気体発生量が多くなるが、50℃になると発生量が減少する。気体の発生が見られなかった3℃、55℃、60℃では酵母はアルコール発酵を行っていないと考えられる。しかし、それぞれの実験を終了した後室温に戻すと55℃、60℃は気体発生がみられなかったのに比べ、氷水中のものは次第に気体が発生し始めた。このことから同じように気体発生がない状態であっても、氷水中では酵母は生きており、55℃、60℃では高温であった為、酵母の酵素のタンパク質が変性を起こし機能が失われてしまい、気体が発生しなかった等の理由を考えることができる。タンパク質の変成を裏付けるように50℃、55℃、60℃での実験後の混合液のろ液は濁り、独特な匂いがしていた。

さらに、図4 Aより各グラフの傾きを求め図4 Bの様なグラフを作成すると、酵母の反応の最適温度は37℃から45℃付近であり、それ以降の温度では気体発生量が大きく減少することが確認された。

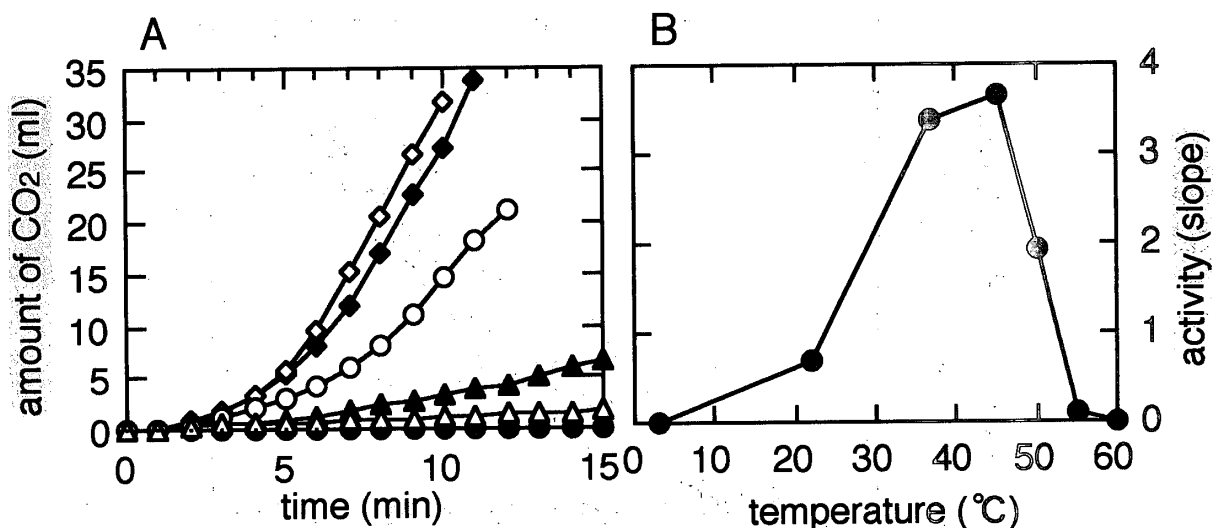


Fig.4 Generation of CO₂. A:Relationship between amount of generated gas and reaction time. ●,3 and 60°C; ◆,37°C; ◇,45°C; ○,50°C; △,55°C; ▲,22°C; B:graph of relationship between reaction speed and reaction temperature.

今回の実験には恒温器を用いたが、恒温器を用いなくても小さめの発砲スチロールの容器にお湯を注ぎ目的の温度にして蓋をすると、一定温度を保つことができ、実際の測定にも使用可能であった。

基質の検討

次に教科書ではスクロースを基質として用いる例が多いが、スクロース以外の糖類を基質にした場合でも、アルコール発酵が起こるかどうかをこの実験装置を用いて検討した。この実験では先の実験で用いた二糖類のスクロース以外に、単糖類であるグルコース ($C_6H_{12}O_6$)、フルクトース ($C_6H_{12}O_6$)、ガラクトース ($C_6H_{12}O_6$)、二糖類のマルトース ($C_{12}H_{22}O_{11}$) を用いた。その結果グルコース、フルクトースは気体発生がスクロースとほぼ同じ程度確認できたが、マルトース、ガラクトースは気体発生が無かった (図5)。加えて、今回調べたグルコース濃度 (2.5%と5%) では気体発生量に大きな違いがないことも確かめられた。また、糖類を含む清涼飲料水を基質にしても気体発生が確認できた (結果未掲載)。この様に本実験装置が酵母の発酵に適した基質を調べる実験に利用できることも分った。

まとめ

今回開発した実験装置は、発生する気体量の測定、発生した気体が二酸化炭素であることの確認、アルコール生成の確認、グルコース消費の確認、アルコール発酵における諸条件下での酵母反応の比較、に利用できる事が分った。本装置は扱いも簡単であり、装置の各部分は簡単に入手できるものであり、調味料入れは1個あたり100円、注射器は約150円と単価が低く、多くの個数を用意することも可能である。さらに、実際に学校の授業に合わせ、様々に応用することも可能であり、幅広く利用さ

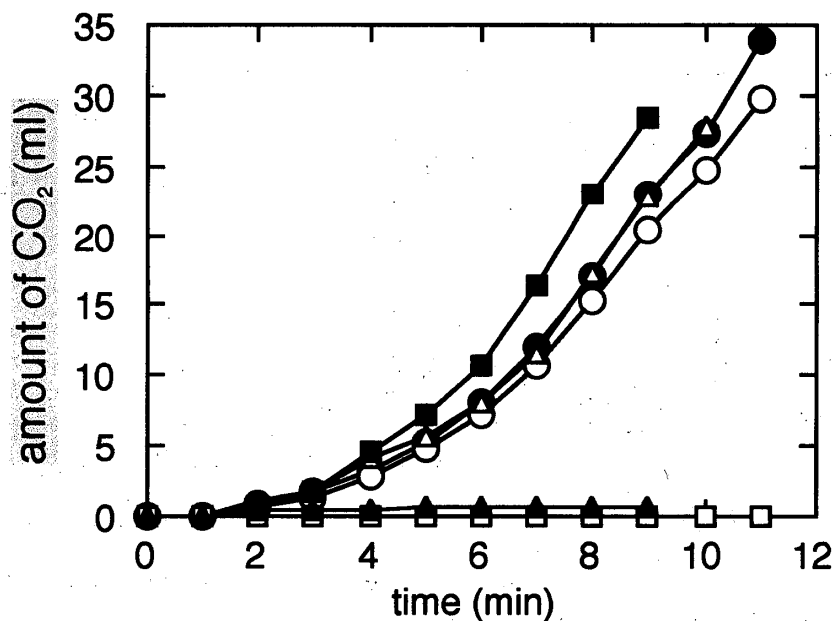


Fig.5 Graph of relationship between generation of CO₂ and some substrates.

●,5% sucrose ; □,5% galactose ; ■,5% fructose ; ○,5% glucose ;
 △,2.5% glucose ; ▲,5% maltose ;

れる実験装置を開発できたものと考えている。

引用文献

- 1) 田中隆莊ほか (1999) 新生物 I B 第一学習社
- 2) 水野丈夫ほか (1997) 生物 I B 東京書籍
- 3) 太田次郎ほか (1995) 図解フォーカス総合生物 新課程用 啓林館新興出版
- 4) 愛知生物サークル編 (1999) いきいき生物のびのび実験 新生出版
- 5) 栃木県教育センター編 (1995) 理科の探究活動指導における効果的な観察実験
- 6) 山本大二郎ほか (1973) 増訂化学実験事典 講談社
- 7) 日本化学会編 (1966) 実験化学講座 続5 有機化合物の定性確認法 (中) 丸善
- 8) 化学大辞典編集委員会編 (1961) 化学大辞典 共立出版

(平成15年9月29日受理)