

生物化学実験のスモールスケール化 ーポリフェノールオキシダーゼによる 緑茶の酸化反応ー

巻本 彰一・四月朔日 秀崇*

A Scaling Down of Biological Chemistry Experiment
ー Oxidative Reaction of Green Tea by Polyphenol Oxidase ー

Shoichi MAKIMOTO and Hidetaka WATANUKI *

Accepted November 11, 2019

抄録：ポリフェノールオキシダーゼはポリフェノールを酸化する酵素であるが、この酵素は多くの果物や野菜に含まれている。しかし、中学校では消化系酵素しか学ばないため、生体内でほぼ全ての生命活動に酵素が関わっていることを理解していない生徒が多い。今回はゴボウ由来のポリフェノールオキシダーゼを用いて緑茶を酸化し、水溶液の変化から酵素の働きを理解する教材を作成したので、中・高等学校および大学での授業の実施例を紹介する。

索引語：ポリフェノールオキシダーゼ，緑茶，ゴボウ，酵素反応

Abstract: Polyphenol oxidase is an enzyme that oxidizes polyphenols and is contained in many fruits and vegetables. However, since junior high school students learn only about digestive enzymes, many students do not gain adequate understanding of how enzymes are involved in almost all biological activities in the body. In this study, we used a burdock-derived polyphenol oxidase to oxidize green tea and created teaching materials to instruct students about the function of enzymes from changes in aqueous solution. We introduce examples in operation in junior high school, high school, and undergraduate classes.

Key Words: polyphenol oxidase, green tea, burdock, enzyme reaction

* 富山県魚津市立上野方小学校

1. はじめに

酵素は生体触媒であり、新陳代謝、運動、構造保持など、生体内で起こっている反応のほとんど全てに関わり合っている。酵素の役割は、その基質に対して選択的にかつ効率のよい経路で、反応速度に影響を与えるだけでなく、場合によっては反応速度の調節を行うなど、生物の生命活動に不可欠なものである。それにも関わらず、日常的には「酵素」や「酵素反応」についてあまり意識をすることはない。例えば、皮をむいたリンゴをしばらく放置しておくとしリンゴ中に含まれる酵素(ポリフェノールオキシダーゼ)の作用により、含まれているポリフェノールが酸化し褐変する¹⁾。この現象はよく目にするが、酵素や酵素タンパク質の性質を学習する教材はごく限られていて、現行の教科書²⁾では酵素の性質については中学校2年生で体内の消化酵素の働きとして初めて学習する。酵素の種類は六大分類から、反応別に酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、リアーゼ、異性化酵素、リガーゼに分類されるが、中学校では加水分解酵素の一部である消化に関わる酵素しか学習していないので、リンゴの変色のような現象を、酵素の作用である、と考えたことのある子どもはほとんどいない。

近年は酵素入りと名をうった製品が多くみられるようになり、テレビコマーシャルなどでも酵素という言葉をよく聞くようになったことから、酵素という用語は子どもにとっても日常生活でよく耳にする言葉となった。しかし統計が少し古いが2005年3月に、前年6月に単元「生命を維持する働き」³⁾において消化酵素について学習済である京都教育大学附属京都中学校2年生106名に「酵素はどこなところ(生物や製品)で利用されていますか」とアンケートを実施⁴⁾したところ、「60%が洗剤、16%が食品、11%が消化器官、医薬品が6%、わからないが7%」の回答であった。9ヶ月前に学校で学んだはずの消化器官と答えた生徒はわずか1割であった。

中学校2年生で教える、唾液によるデンプンの加水分解反応で、生成した糖を検出するヨウ素デンプン反応の実験²⁾は、もれなく全国で行われていると思われるほど実施率が高い。その時に、唾液中の消化酵素がデンプンを糖に分解することを確認し、消化酵素は大きな分子を小さな分子に変える働きがあると学んでいるが、実施したアンケートからは生命活動と酵素の関係に対しての知識が身についているのかは疑問である。したがって、酵素の性質について学習後の段階で子どもたちに酵素に関する知識の調査を行い、酵素に対する概念形成の現状と、現行の酵素の性質を学習する教材について検討することが必要であると考えられる。

そこで、生徒実験として消化酵素以外の酵素反応に関する教材を開発することにした。野菜や果物の褐変に見られるポリフェノールオキシダーゼ(PPO)触媒による酸化反応は分かりやすいが、りんごの場合は誰もが色の変化を捉えており、興味や驚きに欠ける。それゆえ、身近な事物で、新鮮でかつ視覚に訴える教材の一つとして、緑茶の変色つまり紅茶発酵における酵素反応を取りあげた。

緑茶に含まれるカテキン類はPPO触媒による酸化反応によってテアフラビン類に変化し紅茶特有の赤色を形成する⁵⁾。一般に、紅茶発酵は茶葉中に含まれるPPOによって触媒されるが、紅茶の産地以外では生茶葉は入手にくい。しかし、PPOはナシ、リンゴ、ジャガイモ、ゴボウなど様々な植物に含まれている。そこで、時期を問わず入手できる利便性、保存性、経済性の面で優れていることからゴボウを材料として選択し、ゴボウより粗製したPPOを酸化反応に使用することにした。そして、種々の条件でPPOを緑茶に加え、その水溶液の変化を観察し、反応機構を考察することを目的として素材実験を行った。

ところで、学習指導要領に示された中学校理科の目標は、1998年度の課程⁶⁾においては「自然に

対する関心を高め、目的意識をもって観察、実験などを行い、科学的に調べる能力と態度を育てるとともに自然の事物・現象について理解を深め、科学的な見方や考え方を養う。」だった。また、2006年度の課程⁷⁾においては「自然の事物・現象に進んでかわり、目的意識をもって観察、実験などを行い、科学的に探究する能力の基礎と態度を育てるとともに自然の事物・現象についての理解を深め、科学的な見方や考え方を養う。」という記述に変化した。生徒に科学的な見方や考え方を養う探究活動の重要さは長い年月にわたって変わっていない。つまり、「目的意識をもって」とあるように観察、実験を受け身的に行うのではなく、目的や自分なりの仮説や予想をもって観察、実験に臨むこと、つまり科学的思考過程に基づいて探究活動を行うことが大切である。そのためには、子どもが事象に対して「なぜ、そうなるのか」という関心を持つこと⁸⁾が不可欠である。

子どもが関心を持つ事象は、魅力的な実験・観察や、生活体験、自然体験そして生徒自身の知識・アイデアなどである。酵素の性質を学習する教材においても、生徒は自分自身で仮説をたて探究活動を深めていける⁹⁾ように、数回の実験を行った後、お互いの結果を比較し、もともとの実験条件の違いから結果が異なった理由を推定する、という方法を繰り返して仮説の検証を行う内容にした。それにより、実践を通して、探究活動を取り入れた理科教育を目指す、子どもに身につけさせたい力の育成を図るために、中高生を対象に50分～2時間の生徒実験としての実践授業を行い、教材としての有効性を検討した。また、大学生が酵素反応を理解するための簡単な教材としてスモールスケール化を進めた。その結果、当初の目的を達したと考えられる実験方法が開発できたので紹介する。

2. ポリフェノールオキシダーゼを用いた緑茶の酸化実験

緑茶に含まれるカテキン類は、PPO触媒による酸化反応によってテアフラビン類に変化し、紅茶特有の赤色を形成する。紅茶の色は3種のテアフラビン類の混合物¹⁰⁾であり、図1に示すようにテアフラビンはカテキン類の二量体である。

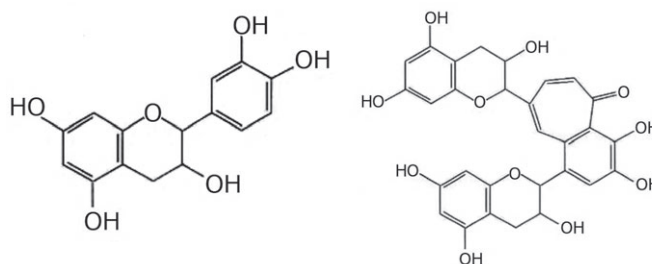


図1 カテキン（左）とテアフラビン（右）の構造式

ところで、緑茶の製造では最初に葉を蒸すという加熱操作を行うため、緑茶にもともと含まれていたPPOは失活する。それゆえ、外部からPPOを加えなければ緑茶を酸化させて紅茶にすることは難しい。触媒がなくても空気酸化で反応は進むが、非常に時間がかかる。緑茶に外部からPPOを加えて酸化させ紅茶を作る試みは色々とあり、1982年には*Alternaria tenuis* A-2株の生産するPPOを使用して、緑茶抽出液が細菌のPPOにより容易に酸化され褐変化することが報告¹¹⁾されている。また1991年にはゴボウのPPOを用いた実験例¹²⁾や2002年には22種類の植物由来のPPOを用いた実験例¹³⁾が報告されている。さらに、家庭でできる実験例として果物由来のPPOを用いる方法も紹介されている¹⁴⁾。

PPOは多くの植物にあるが、時期を問わず入手できる利便性、保存性、経済性を考えると、ゴボウ由来のPPOの使用が優れていると思われる。しかし野菜由来のPPOには欠点もあり、カテキン類を酸化してテアフラビンを合成した後、さらに酸化が継続してテアフラビン分解を行う点と、酵素活性が低い点である。過去の研究例では、ビワやナシはリンゴやブドウより数倍テアフラビン合成能力

が高く、ゴボウはビワやナシと比べて 1/20 の合成能力であることが報告¹³⁾ されている。生物化学実験では材料が時期を問わず安価で入手できる利便性は非常に魅力的であり、活性の低い点は実験条件でカバーすることにした。将来的には活性低下の少ない酵素の冷凍保存等で果物由来の PPO についても行ってみたい。

ゴボウの PPO の調製方法としては、MOTODA¹¹⁾、桶川¹²⁾ らの方法を簡略化して行うことにした。内容的には、ゴボウを粉碎して不要部分をアセトンで抽出し、残渣を乾燥させて粗製 PPO を調製した後、酵素の有無、緑茶の有無、空気（酸素）有無、加熱の有無などの種々の条件を変えて実験結果を比較する流れとなっている。それにより、酵素の働き、酵素タンパク質の熱変成、酵素の反応機構を考察することを目的として観察実験を行った。

以下の一連の実験は、もともとは中学生や高校生向けの教材を作成するときに、予備実験として何回か試行錯誤の上で条件設定をしたものであり、京都教育大学理科領域専攻に「有機・生物化学実験」として開設されている授業科目の一部分でもある（2019 年度以降は科目の合併により「化学実験」となった）。この授業科目の受講生の主体は 2, 3 回生であるが、非常に簡単に消化系酵素以外の酵素反応を学べることと、探求学習の作成方法を学ぶために、現在でも内容は変更せずにスモールスケール化して行っている。この大学生向けの実験は、粗酵素の調製、酵素の性質、酸素の働き、吸収スペクトルの変化の順で構成されている。最初に酵素の働きからそれぞれの変化を推定して作用機序の仮説を立て、実験後にそれぞれの結果を比較し、もとの実験条件の違いから仮説を検証する、というやり方を繰り返す。しかし、中学生・高校生に行う場合は、内容を学年に合わせた探求学習とする必要があるので、3 章で述べる。

2. 1 実験操作

試料と実験器具

ゴボウ（北海道産）、緑茶（「青柳」お茶の丸幸株式会社）、アセトン（min.99.5% 和光純薬株式会社）、おろし金、シャーレ、ポット、試験管、ティーパックまたは茶葉と茶こし、ビーカー、乳鉢、乳棒、電子天秤、紫外可視分光光度計

粗酵素の調製（以下の量は、①②④は全グループ量（4 班分）、③はグループ毎である）

①ゴボウ 10g をおろし金を用いてすりおろした後、シャーレに移してアセトン 50mL に 15 分浸した後ろ過した（図 2）。

②残留物をさらにアセトン 20mL で洗浄した後、乾燥させた（図 3）。得られた粉末を乳鉢で微粉末状にしたものを粗酵素として使用した。乾燥させる方法は、当日に粗酵素が必要な場合はアセトン洗浄した残留物をろ紙で挟んで乾燥させるが、翌日以降に引き続いて実験が行える場合は、ろ紙上の残留物をそのまま冷蔵庫に入れておくと乾燥して粉末となる。



図 2 不要部分のアセトン抽出

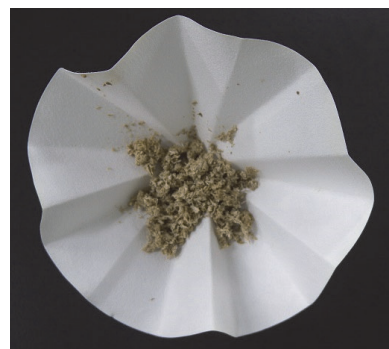


図 3 乾燥させた PPO 粗酵素

③粗酵素 0.03 g を試験管に入れ、水 2 mL 加えて 10 分間湯煎した（煮沸時間が 10 分間）。それをろ過して得られた残留物を加熱処理済粗酵素として使用した。

④緑茶の調製として、ティーパック 2 袋もしくは茶葉 20 g を 400mL のお湯（95℃）で煮出し 30 分放冷したものを使用した。

2. 2 観察方法と結果

観察実験 1. 酵素の性質を理解する実験

緑茶に対するゴボウ由来の粗酵素の反応を見るために、粗酵素への加熱の影響を見るために、下記の試料 A ～ D をシャーレに入れ攪拌し、20 分後の変化を観察した。（図 4）

A：緑茶 10 mL（図 4 右下）

B：緑茶 10 mL と加熱処理済粗酵素 0.03 g（同右上）

C：緑茶 10 mL と粗酵素 0.03 g（同左下）

D：蒸留水 10 mL と粗酵素 0.03 g（同左上）

図 4 の結果から、試料 C のみ赤色に変化したことが分かる。また、加熱処理をされた酵素では色の変化がないことが分かる。

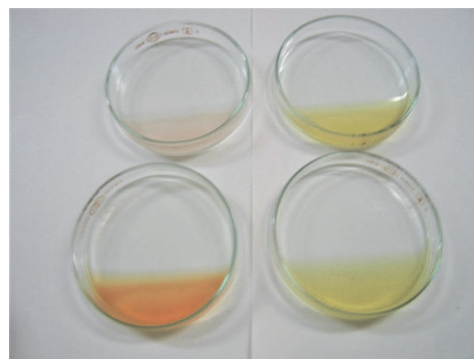


図 4 20 分後の変化（シャーレ）

もし、試験管で色の変化を見る場合は、それぞれ約 5mL 程度で十分に色の変化を確認できる（図 5）。図 5 では左から A ～ D の順に並んでいる。

図 4 と図 5 からは、緑茶に粗酵素を加えた試料は水溶液が変化し、赤味を帯びたことが視認できる。緑茶に加熱済粗酵素を加えた試料、蒸留水に粗酵素を加えた試料からは、いずれも水溶液の変化は視認できなかった。また、この実験は 10mL のサンプル管ビンでも行うことができるが、その場合はキャップを開放する方が早く結果が見られる。

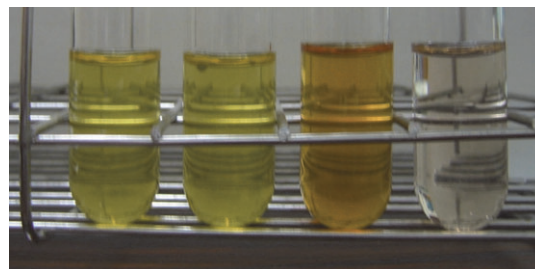


図 5 20 分後の変化（試験管）

観察実験 2. 空気（酸素）の働きを理解する実験

この PPO の酸化還元反応には酸素が使用されていることを確認するために、下記の試料 E ～ F を 6 mL サンプル瓶に入れ 20 分後の変化を観察した（図 6）。試料 F は、瓶の口まで試料を入れることで試料が空気と触れる表面積を小さくした条件となっている。

E：緑茶 2mL と粗酵素 0.01 g

F：緑茶 6.5 mL と粗酵素 0.035 g

F の酵素量は、比率を合わせるのなら 0.0325g となるが天秤の精度上多い目に入れてある。

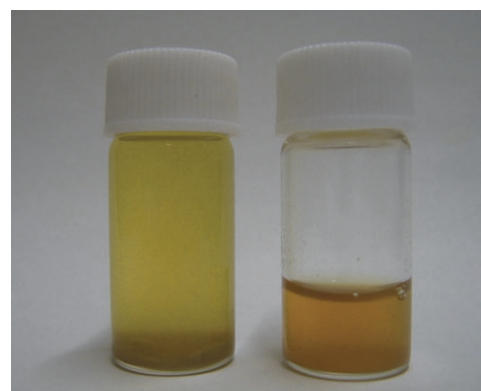


図 6 空気（酸素）の影響

図 6 では右が条件 E で、左が条件 F の結果である。空気に触れる表面積が大きいと、水溶液の色が変化してより赤味を帯びることが視認できる。

観察実験 3. 吸収スペクトルの変化

酸化反応の進行とともに水溶液は赤くなるが、生成物を吸収スペクトルで確認するために、緑茶 10mL に粗酵素 0.045g を加え攪拌し、その紫外可視吸収スペクトルの変化を 20 分後まで 5 分毎に測定したものが、図 7 である。また、緑茶 10mL に粗酵素 0.045g を加え攪拌し、20 分間放置した試料、および、比較のために緑茶を 20 分間放置した試料をそれぞれ 60 倍に希釈した試料の 230 ～ 400 nm の範囲での紫外可視吸収スペクトルを測定したものが図 8 である。図 7 からは酵素反応の進度（時間経過）とともに 420 ～ 600 nm までの吸光度が増加し、図 8 からは緑茶に粗酵素が入ると 270 nm 付近の吸光度が減少した。

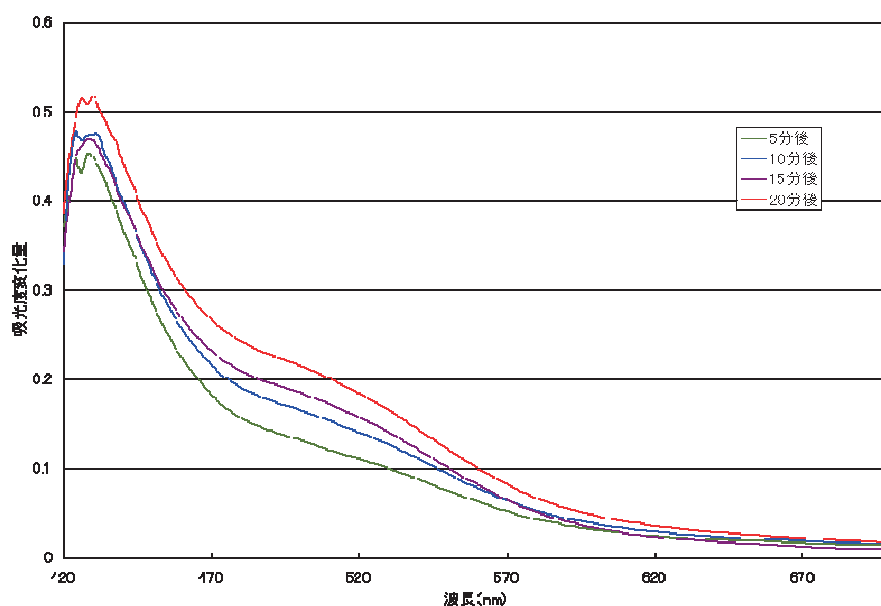


図 7 緑茶に粗酵素を加えた後の吸光度変化（420 ～ 700nm）

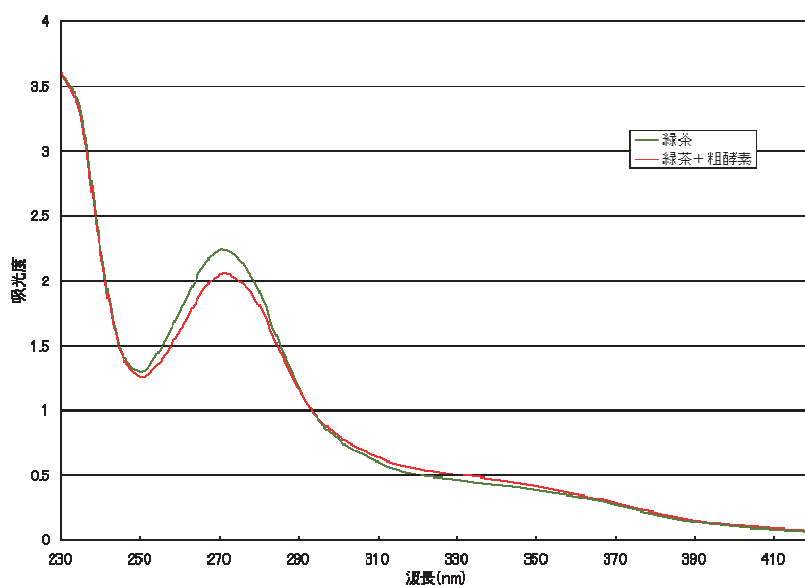


図 8 緑茶に粗酵素を加えた後の吸光度変化（230 ～ 420 nm）

2. 3 考察

観察実験 1

図 4 と図 5 からは試料 C (緑茶+粗酵素) のみ変色が確認された。試料 D (蒸留水+粗酵素) から変色が見られなかったことと比較すると、粗酵素から色素が染み出したのではなく、緑茶の成分が変色したことがわかる。また、試料 B (緑茶+加熱処理済粗酵素) から変色が見られなかったことから、粗酵素が加熱によって熱変性したことがわかる。野菜の PPO は 70℃ から 90℃ で熱安定性が低下する¹⁵⁾が、種類、品質、および産地で熱安定性は異なる。それゆえ、念のため加熱処理済粗酵素の作成には 100℃ で 10 分間煮沸としている。

観察実験 2.

図 6 より、空気に触れる表面積の大きい試料からより強く変色が確認されたことにより、本実験の反応には空気 (酸素) が必要であることがわかる。溶液中で酵素が酸化反応をして酸素を消費しても、空気が上部にあると、そこから酸素を取り込んで反応が継続できるからである。

観察実験 3.

カテキン類は PPO の働きでキノン化した後に結合してテアフラビン類 (微赤色) となる¹⁾。図 7 から、緑茶に粗酵素を加えると、420 ~ 600 nm 位までの波長の吸収量が増えたことが確認された。PPO は 2 個の銅イオン Cu^{2+} を持つ金属酵素である¹⁶⁾ が、溶液中での濃度とすれば非常に薄いため、可視部で銅イオンの特有の吸収である青緑色が見えることはない。緑茶は 430nm までの紫色の光を吸収するので、この変化は、テアフラビン類が生成したためだと推測される。水溶液が橙赤色に見えるのは、光の波長はその長さによって視認できる色が決まっているため (380 ~ 435 nm 紫・藍; 435 ~ 490 nm 青; 490 ~ 560nm 緑; 560 ~ 595 nm 黄; 595 ~ 650 nm 橙; 650 ~ 780 nm 赤), 補色で赤・橙・黄色が強く見えるためである。

図 8 から、緑茶に粗酵素を加えると 270 ~ 280 nm 付近の吸収が減少することが確認された。270 ~ 280 nm に吸収を持つポリフェノールにはカテキン類がある⁵⁾。従って、これは緑茶に含まれるカテキン類が酸化されたためだと推測される。

以上の観察実験を中・高生の生徒実験として導入できるかを検討した。観察実験 3 については、測定装置として紫外可視分光光度計が必要なため、中学校や高等学校で行うことは難しい。しかし、観察実験 1 と 2 については、実験室で揃う通常の器具で実験を行うことができる。またそれらの考察は、専門的知識が必要ではなく、観察実験を比較することで考察することができる。したがって、観察実験 1 と 2 を中学校や高等学校での生徒実験として取り入れることは充分可能である。ただし、実験グループが多いと天秤で質量を測定することに時間を取ってしまうことや過去に学習してきたバックグラウンドが中高生では異なるため、実験操作や興味を持たせるように文言等を修正する必要がある。また、少し古いが 2005 年 3 月に、前年 6 月に単元「生命を維持する働き」³⁾において消化酵素について学習済である京都教育大学附属京都中学校 2 年生 106 名に「酵素の働きは、温度に影響を受けることを知っていますか」とアンケートを実施⁴⁾したところ、「知っている 16%, 知らない 84%」と回答した。それゆえ、酵素タンパク質の熱変性の内容は、中学生では進んだ内容 (発展として触れている教科書¹⁷⁾もある) となるが、加熱による殺菌や、昆虫などの低温動物が冬になると動きが遅くな

ること等、生物と温度との関係に関することなので観察実験2は加えた。

3. 中学校・高等学校での観察実験案

前章の考察によって、電子天秤でゴボウや粗酵素の質量を少量分だけ量るという操作は時間がかかり、また緑茶の変化を測定する20分の時間も授業時間を考慮して短くする必要があった。改良した酵素反応を学習する生徒実験（高校生用）を以下に示す。50分しかない中学生の場合は、各操作を図案化したり、酵素や加熱処理した粗酵素は予め作成しておいて、グループ毎に前に取りに来させるという方法で行った。

＜生徒実験：高校生用＞

実験テーマ：「緑茶が紅茶になる！？－お茶の不思議を探る」

試料と実験器具

緑茶、ゴボウ、アセトン、試験管、ビーカー、シャーレ、葉さじ、ガラス棒、メスシリンダー、漏斗、漏斗台、ろ紙、駒込ピペット、サンプル瓶、乳鉢、乳棒、ガスバーナー、マッチ、三脚、カッター、割り箸、おろし金

操作1. 粗酵素をつくる。

- ①ゴボウの皮をカッターで剥き（先端が変色していれば切り落とす）、先端から約1.5cm分をおろし金ですり、割り箸を用いて100mLビーカーに入れたアセトン50mLに素早く入れる。
- ①ガラス棒で10分間攪拌した後、ろ過するが、濾紙は水でぬらさないで使用し、濾液は100mLビーカーで受ける。
- ③さらにアセトン20mLを注いで残留物を洗浄する。残留物を葉さじでかき取り、乾いた濾紙数枚で挟み余分なアセトンを吸収させる。残留物が乾燥した後、乳鉢で粉碎して粉末にすると粗酵素が得られる。
- ④試験管を2本用意してそれぞれに粗酵素を葉さじ（小）2杯と水1mLを入れる。
- ⑤300mLビーカーにポットのお湯を入れてガスバーナーで加熱して沸騰させ、④の試験管を3分間煮沸する。

操作2. 緑茶の変色を比較する。

- ① シャーレに以下の試料を入れる。
 - A：緑茶 10 mL
 - B：緑茶 10 mL + 粗酵素 葉さじ（小）2杯
 - C：水 10 mL + 粗酵素 葉さじ（小）2杯
 - D：緑茶 10 mL + 湯煎によって加熱処理した粗酵素 1mL
 - E：水 10 mL + 湯煎によって加熱処理した粗酵素 1mL
- ② 15分後それぞれの変化を比較する。

操作 3. 緑茶の変色を比較する。

① 6mL 用サンプル瓶に以下の試料を入れる。

F : 緑茶 2 mL + 粗酵素 葉さじ (小) 2 杯

G : 緑茶 6 mL + 粗酵素 葉さじ (小) 6 杯

② よく攪拌して 15 分後それぞれの変化を比較する。

結果の整理と考察として、実験結果から反応系における仮説をたてる。

考察における学習効果としては、以下のことが理解できるはずである。

試料 A, B, C の比較によって緑茶成分と酵素が反応に必要なこと, 試料 F, G の比較によって, 反応には空気 (酸素) が必要なことがわかる。また, 試料 B, D の比較によって酵素は熱に弱く加熱により変性してしまうことがわかる。つまり, 熱変性という酵素の性質を学習するとともに, 緑茶成分, 酵素, 空気 (酸素), の 3 つが反応系に関係していることを導くという活動から, 仮説を立て物事を考えるという科学的思考を身に付けることも期待できる。

4. 授業実践

茶葉が発酵して紅茶に変化する反応は酵素反応である。茶葉に含まれるポリフェノール (カテキン類) が酵素 (PPO) によって酸化され, 紅茶色素 (テアフラビン類) が生成する。本教材はこの反応機構に着目した。緑茶に, 3 章をもとにした, ゴボウより粗製した PPO を加えると, その水溶液が変化し赤味を帯びる。この反応における PPO をミステリーパウダーとし, 実験からその性質を考察させていく。その上で, 酵素の性質を学び, 仮説をたて検証するという科学的思考過程を身につけさせることを目的としている。

対象は中高生で以下の日程で実践した。このとき, 高校生には, 本実験より導いた仮説を検証させる方法を考えさせ, 検証実験も行わせた。そのため 2 時間の実践授業とした。一方, 中学生には仮説を立てるところまでの考察のみとし, プリントによる知識の検証を行った。また実験内容も, 普通クラスの中学生を対象に粗酵素を作る操作を省いた 50 分間の実践授業, および選択理科のクラスには, 粗酵素を作る操作を加えた 100 分間の実践授業を行った。そして, 実践授業後のアンケート結果から教材としての有用性を検討した。実施校には, 大阪府立北野高等学校 (以下, 北野高校と略す) と京都教育大学附属中学校 (現京都教育大学附属京都小中学校, 以下, 京都中学校と略す) を選んだ。

授業実践 1.

【日時】北野高校 2005 年 12 月 9 日 13:00 ~ 15:00

【対象】SSH 選択希望者 27 名, 【場所】理科教室

授業実践 2.

【日時】京都中学校 (3 年生) 2005 年 12 月 19 日 3 限

【対象】京都中学校 3 年 A 組 男子 20 名, 女子 19 名, 【場所】理科教室

授業実践 3.

【日時】京都中学校（選択理科）2006年2月15日5～6限

【対象】京都中学校 サイエンス（選択理科）男子10名，女子18名，【場所】理科教室

[生徒観]（北野高校）

SSH 選択希望者は2年生と1年生で構成される。2年生は酵素の性質について生物で履修済みであり，酵素の触媒機構，構成物質，基質特異性，最適温度，最適 pH についての知識をすでに獲得している。一方，1年生は酵素の性質について未履修である。したがって，2 学年間で酵素に対する知識には差がある。しかし，本教材では酵素という語を出すことを避けた。したがって酵素という先入観無しに，純粋に反応結果から得られた情報をもとに，その機構に対して仮説をたて検証するという科学的思考過程を身につけることができると思われる。

[生徒観]（京都中学校）

酵素反応については，唾液の消化反応について学習済みである。そして酵素のはたらきとは物質を大きな分子から小さな分子に変えることだと理解している。しかし，酵素の性質についての知識は身に付いていない。したがって，ミステリーパウダー（＝酵素）の性質を考察することは新たな発見につながる。また，反応機構を考察する際には指導者に助言を求めてくることが予想される。このとき，的確な助言を与えれば仮説をたてるという科学的思考過程が身に付くと思われる。

[指導観]

粗酵素をミステリーパウダーとおくことで，酵素という先入観なく反応機構を考察させる。実験結果から得られた情報をもとに，反応機構やミステリーパウダーという未知の物質に対して考察させ，科学的思考過程を身につけさせる。この時，仮説のたてかた，検証方法などについての的確な助言を行う必要がある。生徒自らの力で仮説を導き出すことに重点を置き，必要以上の助言を与えないよう配慮する。

4. 1 実践後のアンケート

以下に実践後のアンケートの設問とその結果（右図）および理由を示す。棒グラフは，左から北野高校，京都中学校，京都中学校（サイエンス）の順である。

設問 1. 今日やったような実験の内容について

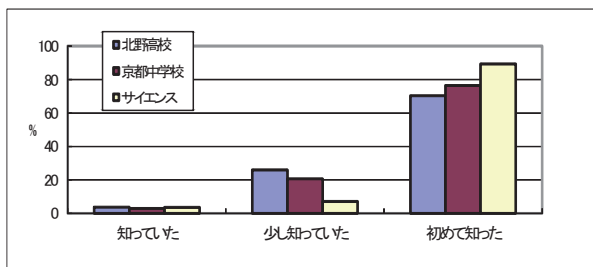


図 9 設問 1 の回答

設問 2. 実験内容に興味をもつことができたか。

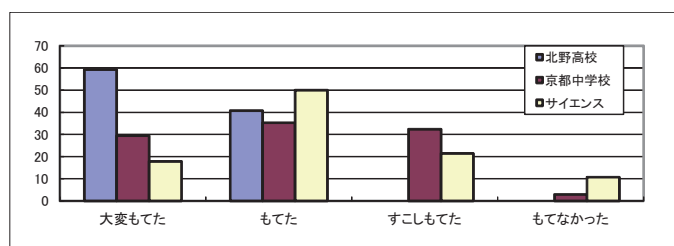


図 10 設問 2 の回答

設問 3. 実験の内容を理解することができたか。

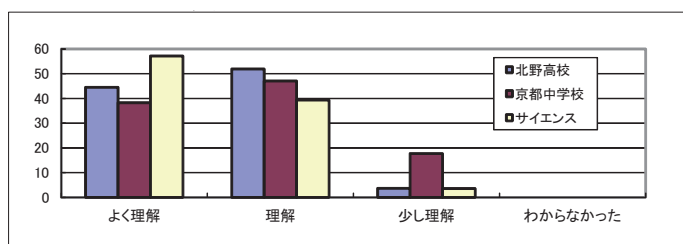


図 11 設問 3 の回答

設問 4. 酵素の性質について理解することができましたか。

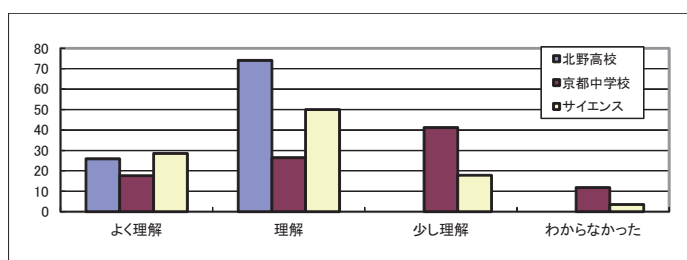


図 12 設問 4 の回答

設問 5. 中学校 2 年生のときに、唾液でデンプンを糖に変化させる実験を行いました。今回行った緑茶の変色の実験はそれに比べてどうでしたか。

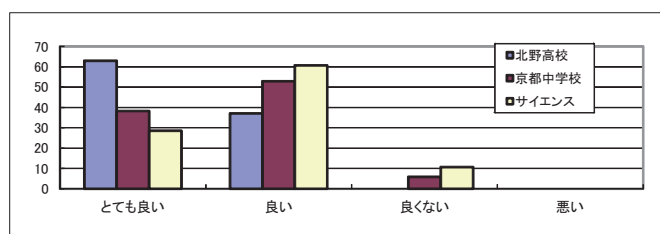


図 13 設問 5 の回答

回答の理由

北野高校

(とても良い)

1. お茶は身近なものであるから。
3. 視覚的に分かるから。
5. 初めてのことで面白かった。

(良い)

1. お茶は身近なものであるから。
3. もう少しはっきり結果が出ればより良い。

京都中学校 3 年生

(とても良い)

1. お茶は身近だから。

2. 変化が分かりやすい。
4. 唾液は汚く、抵抗がある。

2. 唾液の実験よりも興味が持てたから。

2. ユニークな実験だから。

3. 誰が唾液を出すかで大変だったから。
4. 変化がはっきり見ることができたから。
5. 唾液を出すことが恥ずかしくて面白くなかったから。

(良い)

1. お茶は身近なものであるから。
2. やや分かりにくかった。

(あまり良くない)

1. 結果が出るまでに時間がかかるから。
2. ポリフェノールが難しい。

京都中学校サイエンス

(とても良い)

1. 唾液を出すことが嫌だったから。
2. 色々なパターンができたから。

(良い)

1. 初めてやる驚きがあったから。
2. 目で見ているので変化が分かりやすいから。

(あまり良くない)

1. 唾液でデンプンを糖に変化させる実験のほうが分かりやすいから。

設問 6. 唾液でデンプンを糖に変化させる実験を行ったとき、唾液を出すことに抵抗がありましたか。

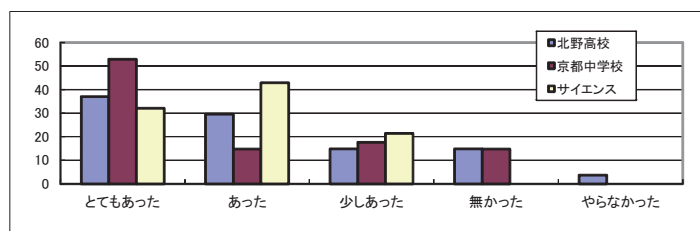


図 14 設問 6 の回答

4. 2 アンケートからの考察

本実践の実験内容については設問 1 の結果に見られるように、2 校種とも 7 割以上が初めて知る内容であった。しかし、実験内容に対する興味は設問 2 の結果に見られるように北野高校では約 6 割もが「大変持てた」と答え、全員が興味を持てたという結果なのに対し、京都中学校では「大変持てた」の割合が 2～3 割、「持てなかった」と答えた生徒がごく少数いて、傾向が分かれている。このことから、同様の教材に対して、校種によって生徒がもつ興味の傾向が変わるということがいえる。

また、設問 3、設問 4 の結果からわかるように、実験内容に対する理解と、酵素の性質に対する理解の度合いには大きな違いが生じた。実験内容に対しては 2 校種とも高い理解を示した。一方、酵素の性質に対しては、「よく理解」と「理解」を合わせて北野高校では全員が理解を示し、京都中学校サイエンスでは約 8 割の生徒が理解を示した。しかし、京都中学校 3 年生では約 5 割にとどまり理解度が低かった。この違いが生じた原因は実験作業の内容の違いにあると考えられる。北野高校と京都中学校サイエンスではゴボウからミステリーパウダーを作る段階から実験を行ったのだが、京都中学校 3 年生では既に調製したミステリーパウダーを使用した。例えばブラックボックスであっても、原材料から作るという行為が思考を深めるきっかけになったのだと考えられる。

設問 5 の結果は生徒による本教材に対する評価を示すものである。比較対象として、中学校理科における代表的な酵素の性質に関する実験である、唾液によるデンプンの糖化反応³⁾を取り上げた。北野高校では 6 割以上が「とても良い」と答え、「良い」と合わせて全員が教材に対して高い評価を

与えた。さらに、京都中学校でも「とても良い」と「良い」と合わせて約9割の生徒が高い評価を与えた。さらに、感想から読みとれるように、仮説をたて検証するという科学的思考が身に付く、学習を深めたいという意欲が沸くといった学習効果もみられ、本教材は有用であったと言える。しかし、「結果がでるまで時間がかかる」「ポリフェノールが難しい」という理由で「良くない」という評価をした生徒もあり、この点は教材としての改善点であり、また、指導者側の工夫が求められる点である。また、「とても良い」理由に、「誰が唾液を出すかで大変だったから」とあるように、中学生・高校生の年代では唾液を出すこと強い抵抗を感じている。そのことは、設問6の結果から顕著にわかる。唾液を出すことに抵抗が「とてもあった」と「あった」を合わせると7割近くにもなってしまう。このような現状では、いざ実験を行おうとしても、唾液を出すことを嫌がり、スムーズに進まない可能性が高い。また、嫌がる生徒に無理矢理強いることも教育上良くない。そんな中で、本実験を、酵素の性質を学習する教材として利用することは、選択の幅を広げるという意味でも有効である。

5. 大学の授業でのスモールスケール化した観察実験

酵素反応を理解するための簡単な教材として、ゴボウのPPOによる緑茶の酸化反応の実験は京都教育大学の授業で15年ほど前から行ってきたが、有機化学実験¹⁸⁻²⁰⁾と同様に生物化学実験についてもスモールスケール化を進めることにした。それゆえ、ゴボウのPPOによる緑茶の酸化反応の実験の活用を目的として、操作性や結果の明瞭性を検証するために、京都教育大学の授業において授業実践を行った。

【日時】京都教育大学 2019年7月25日 12:50～16:05 (3, 4限目)

【対象】京都教育大学「化学実験受講者」2名 (1名大学院生を含む)

この実践では、実験内容が2.1実験操作と同じであるが、観察実験1をシャーレで行わず10mLサンプル管で行った点が異なっている。その結果、全ての観察はサンプル管となり、スモールスケール化が完了した。

アンケート結果をまとめると、サンプル管ビンを反応容器としたことには、(溶液が)混ぜやすい。色の変化が見やすい。使う試薬の量も削減できるし、洗いやすいのでとても良かった。

スモールスケール生物化学実験を体験した感想については、扱いやすい。結果が見やすい。試薬量が少量な点が特徴と書かれているが、一方、欠点については量が少なすぎると秤量や操作に手間取るようである。内容的には、前報¹⁸⁻²⁰⁾のサンプル管ビンを用いたスモールスケール有機化学実験と同様の回答だと思われる。操作については、大学生なので1mg単位で秤量させているが、中高生の場合は小さじ何杯で行っている。少量の試料を精確に測定することも大学生の実験では必要である。この点については、技術を磨いて欲しい。

6. 結論

本教材は探究的に導入することで、生徒に科学的思考過程を身につけさせ、酵素の性質について学習することを目的にした。改善点もあるが、高い学習効果を得ることが可能であると示された。また、唾液によるデンプンの糖化反応に代わる実験として行うことも有用である。また、大学生が消化系酵素以外の酵素反応を理解するための簡単な教材として、ゴボウ由来の PPO による緑茶の酸化反応の実験のスモールスケール化を完了したが、これについても有用な結果であったと思われる。

参考文献

- 1) 木村進, 中林敏郎, 加藤博通『食品の変色の化学』, 光琳テクノブックス, 1995.
- 2) 有馬朗人ら『中学校理科 2 分野上』, 大日本図書, 2017, pp.105-106.
- 3) 有馬朗人ら『中学校理科 2 分野上』, 大日本図書, 2002, pp.105-106.
- 4) 四月朔日秀崇「酵素タンパク質の変性機構に関する熱力学的研究」, 京都教育大学修士論文, 2006.
- 5) 林孝三編, 増訂「植物色素ー実験, 研究への手引き」養賢堂, 1988.
- 6) 中学校学習指導要領(平成 10 年 12 月)解説ー理科編ー.
- 7) 中学校学習指導要領(平成 18 年 7 月)解説ー理科編ー.
- 8) 江田稔「「生きる力」を育てる探求活動」『化学と教育』, 52 (9), 2004, pp.616-619.
- 9) 村上忠幸「理科・化学の探求活動を実現するために必要なこと」『化学と教育』, 53 (1), 2005, pp.28-31.
- 10) 竹尾忠一・大沢キミ子「紅茶の水色に関する研究(第 3 報) テアフラビン(紅茶赤色色素)の分離と分別定量」『日本食品工業学会誌』, 19 (9), 1972, pp.413-417.
- 11) Setsushi MOTODA “Enzymic Treatment of Cocoa, Coffee and Tea with Polyphenol Oxidase,” Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29 (1), 1982, pp.11-15.
- 12) 桶川芳仁ら「ゴボウの褐変に及ぼす塩漬時のクエン酸処理の影響」『山梨県工業技術センター研究報告』, 5, 1991, pp.87-92.
- 13) 田中隆「緑茶カテキンの酸化と紅茶色素の生成」『化学と生物』, 40 (8), 2002, pp.513-518.
- 14) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 天然物化学研究室, <http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/natpro/research/blacktea.html> (2019 年 7 月 15 日閲覧)
- 15) 若山忠明, 関根由喜「野菜のポリフェノール酸化酵素の部位別活性と熱感受性」『日本調理科学会誌』, 36 (3), 2003, pp. 243-248.
- 16) 村田容常「酵素的褐変とその制御」『化学と生物』, 45 (6), 2007, pp. 403-410.
- 17) 有馬朗人ら『中学校理科 2 分野上』, 大日本図書, 2017, p.108.
- 18) 巻本彰一, 藤田義人「有機化学実験のスモールスケール化ーサンプル管ビンを反応容器とした脂肪族エステル合成ー」『京都教育大学紀要』, 133, 2018, pp.7-19.
- 19) 巻本彰一, 藤田義人「有機化学実験のスモールスケール化Ⅱーサンプル管ビンを反応容器とした芳香族エステル合成ー」『京都教育大学紀要』, 133, 2018, pp.21-33.

- 20) 巻本彰一ら「有機化学実験のモジュール化Ⅲーサンプル管ビンを反応容器としたニトロベンゼンとアニリン合成ー」『京都教育大学紀要』, 134, 2019, pp.1-12.

