



第2回

科学の甲子園 全国大会

実技競技 ①「灘の酒」

⌘ 解説 ⌘

生物は呼吸によって有機物を分解し、生命活動に必要なエネルギーを得ている。呼吸では一般に酸素を消費する（好気呼吸、酸素呼吸）が、酵母菌やカビなどの微生物は、無酸素状態でも呼吸ができる。これを無気呼吸や嫌気呼吸といい、このとき生成する物質が私たちにとって有用な場合を「発酵」、有害な場合を「腐敗」といって区別しているが、微生物の代謝作用である点では同じ現象である。

酵母菌は空気中では通常の呼吸（好気呼吸）を行い、糖（グルコース）を二酸化炭素と水に分解して、グルコース 1mol あたり ATP 38mol のエネルギーを得ているが、酸素不足の状態では、糖をピルビン酸（ $\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{H}$ ）を経て、エタノールと二酸化炭素に分解し、ATP 2mol のエネルギーを得ている。これをアルコール発酵と呼び、古くから知られている現象である。歴史的にも、200 年以上前からフランスのラボアジェやパスツールなどがアルコール発酵の研究にかかわっており、関連した研究分野でブフナーやクレブスなど、多くのノーベル賞受賞者を輩出している。次に、これまでの研究で明らかになったアルコール発酵の反応機序を示す。

【アルコール発酵の反応機序】

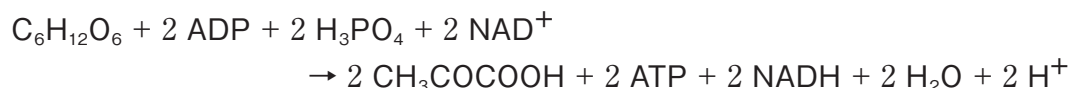
本実験におけるアルコール発酵の反応機序は次のとおりである。

1. スクロースの加水分解

スクロースは、グルコース（ブドウ糖）とフルクトース（果糖）が結合した二糖類であり、酵母の酵素（インベルターゼ）によってグルコースとフルクトースに加水分解される。

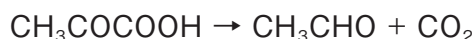
2. 発酵の第一段階

1mol のグルコースは酵母の解糖系にある複数の酵素によって 2mol のピルビン酸に分解される。この段階は、酸素呼吸と共通の反応機序である。（ NAD^+ 、 NADH は補酵素）

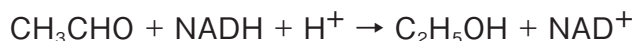


3. 発酵の第二段階

アルコール発酵特有の反応であり、酵素の作用により、1mol のピルビン酸から 1mol の二酸化炭素が取り除かれ、アセトアルデヒドが生成する。



その後、アセトアルデヒドはアルコール脱水酵素と還元型 NADH の電子によって速やかに還元されエタノールになる。



上記 2, 3 の反応をまとめると、アルコール発酵の化学反応式は次のように表すことができる。



なお、多くの酵母は、無酸素状態の嫌気条件でのみアルコール発酵を行い、酸素のある好気条件ではアルコール発酵を行わず、ピルビン酸を完全に分解して水と二酸化炭素に変えるが、本実験で使用したパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、後述するように、酸素があっても発酵を好むため、適当な条件を選ぶと好気条件でもエタノールを生産する。

【競技のポイント】

本競技では、アルコール発酵の定量的な探究を試みることをテーマに設定した。

競技前半では、与えられた条件のもとに、一定時間内で、実験の手順や操作を考えて装置の組み立てや発酵液の調製をすばやく行い、適切な発酵条件のもとに、いかに長い時間発酵させられるか、という点がポイントになる。発酵についての事前の学習や競技の準備に加え、チームワークが発揮される場面でもある。

競技後半のポイントは、CO₂ 検知管の測定範囲を考慮した捕集気体の希釈方法やガス採取器の操作とともに、測定した濃度から捕集した CO₂ の全物質量や発酵液に溶解した CO₂ の物質量を論理的に求めることである。

実験では多かれ少なかれ測定誤差は免れない。本競技でも、例えばシリンジ1つをとっても、ピストンとシリンダー間の摩擦や目盛そのものの精度にも誤差の原因が内在している。また、濃度測定に使用した CO₂ 検知管の精度も高くない。大切なのはそれらを認識できるか否かであろう。測定誤差が大きいのは承知の上で、様々な角度から探究し、考察を試みて欲しい。

【考察例】

まず、本競技における実験や定量的な探究に必要な事項について考察してみる。

1. アルコール発酵の最適条件について

- ・基質特異性… 酵母はグルコース(ブドウ糖)、スクロース(ショ糖)、フルクトース(果糖)を呼吸基質とする。なお、スクロースは酵母の持つ酵素(インベルターゼ)で分解されグルコースとフルクトースを生じる。
- ・基質濃度… 本競技の条件下では、基質濃度が高いほど反応速度は大きくなると考えられるが、基質の量が多いと溶解させるのに時間を費やすことになる。また、発酵液の浸透圧が大きくなりすぎると、酵母の活性が低下する。
- ・最適温度… 温度が低すぎると、通常の化学反応同様に反応速度が低下するが、高温(約70℃以上)ではタンパク質が熱で変性し失活する。反応速度が最大となるのは約45℃前後と考えられ、この最適温度を持続させることが大切である。

2. 温水の調整法について

- ・本競技では発酵液の保温のための給湯は初めの1回だけに限られており、保温容器の性能とともに発酵を開始させる温度、すなわち、温水の調整法が極めて重要になる。
- ・質量 m_1 (g)、比熱 c_1 (J/g·K)、温度 t_1 (℃) の湯と、質量 m_2 (g)、比熱 c_2 (J/g·K)、温度 t_2 (℃) の水を混合するとき、熱平衡の状態における温度を t (℃) とすると、湯が失った熱量と水が得た熱量は等しいので、次の関係が成り立つ。ただし、単純化のために、容器等の熱容量については無視し、発酵液と水の比熱、温度は等しいとした。

$$m_1 c_1 (t_1 - t) = m_2 c_2 (t - t_2)$$

- ・発酵の最適温度 $t = 45^\circ\text{C}$ 、お湯の温度 $t_1 = 80^\circ\text{C}$ 、水の温度 $t_2 = 15^\circ\text{C}$ 、お湯と水の質量の合計 $m_1 + m_2 = 1000$ g (試験管を浸したときの温水の全量) とすると、 $c_1 = c_2 (= 4.2\text{J/g}\cdot\text{K})$ だから、加える湯の量 $m_1 = 1000 \times (45 - 15) / (80 - 15) \doteq 460\text{g}$ 、水の量 $m_2 = 1000 - 460 \doteq 540\text{g}$ (内、80g は発酵液の水の量) となる。

しかし、本競技ではある程度手探りで温度調整せざるを得ないのが実際であろう。

実技競技 ①

- ・また、発泡スチロールコンテナのように保温性能に優れた容器を使用するとしても、時間経過に伴う湯の温度の低下は避けられない。給湯が1回に限られていることを考慮すれば、実際には発酵開始温度をやや高めに設定して調整すべきであろう。
- ・さらに、本競技で使用した酵母が乾燥酵母であることや糖を溶かす必要があることを考え、発酵液の調製を保温容器の温水で湯煎しながら行う工夫をすれば、調製時間の短縮、すなわち発酵時間の確保につながるであろう。

3. 気体の状態方程式について

- ・捕集した CO_2 の物質質量 n (mol) を求めるためには、 $n = PV / (RT)$ より、 CO_2 の圧力 (分圧)、体積、温度がわかればよいが、これらの値は次のように実験の測定値と関連づけられる。
 - ① CO_2 の分圧 = 全圧 (大気圧) \times CO_2 濃度 ※大気圧は競技中に示された値
 - ② CO_2 の体積 = 気体捕集量
 - ③ CO_2 の温度 = 室温 ※室温は競技中に示された値
- ・ CO_2 濃度は検知管で測定した濃度と希釈した割合から求めればよい。(ただし、後述の考慮すべき事項1. 試験管上部やチューブ内の空気による希釈の影響に注意すること。)

4. ヘンリーの法則について

- ・気体の溶解度は次のヘンリーの法則で表される。
「溶解度の小さい気体が、一定温度で一定量の溶媒に溶けると、溶解量 (物質質量や質量) は、その気体の圧力 (分圧) に比例する。」
- ・気体の溶解度は、気体の圧力が 1.013×10^5 Pa のとき、溶媒 1 mL に溶解する気体の体積 (mL) を、標準状態 (0°C , 1.013×10^5 Pa) に換算して表すことが多いが、本競技もそれになっている。
- ・発酵液 (試験管内の水) は CO_2 で飽和しているが、その溶解量はヘンリーの法則から次の①～③で求められる。
 - ① 発酵実験終了時の発酵液の温度における CO_2 の溶解度
 - ② 水の量 = 発酵液の調製に用いた水の量で近似する
 - ③ CO_2 の分圧 = 全圧 (大気圧) \times CO_2 濃度

次に、定量的な探究 (計算) を試みる際に、本競技で考慮すべき事項について考察してみる。

1. 試験管上部やチューブ内の空気の影響

発酵で発生した CO_2 は試験管上部やチューブ内の空気をシリンジ内に押し出し、シリンジ内に捕集される CO_2 を希釈するであろう。この希釈された CO_2 を競技後半でさらに希釈して濃度を測定することになる。ただし、空気の影響は1本目のシリンジに捕集した CO_2 に対してのみ考慮すればよいはずである。つまり、2本目以降のシリンジにも CO_2 を捕集した場合には、1本目と2本目以降で CO_2 濃度が異なるはずであり、少なくとも2回の濃度測定が必要になる。空気の影響を考慮するためには、空気の体積 (試験管の内径や温度計の径、空気層の高さ、チューブの内径や長さ) をあらかじめ測定しておくべきであろう。

ところで試験管上部やチューブやガラス管内の空気には当然約20%の酸素が含まれており、単に CO_2 量の物理的測定を考慮すればよいというものではないことに気づくであろう。すなわち、冒頭で述べたように、酵母菌では酸素があれば好気呼吸を行うとされてい

実技競技 ①

る。すると好気呼吸の結果 CO_2 やアルコールが発生しなくなることになる。しかし、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、実はこの酸素の存在をほとんど考えなくて良い。この種の酵母では、基質、すなわちスクロースやグルコースが mM (ミリモル) 以上の濃度だと (本実験ではそれよりも十分に高濃度である) 酸素があっても好気呼吸が抑えられ、アルコール発酵が進むのである。これはクラブトリー効果として知られており、有酸素状態では好気呼吸が盛んとなり発酵が抑えられというパスツール効果とは反する現象が起こるからである。クラブトリー効果はある種の腫瘍などでも知られており、このように生物が環境に応じて様々な代謝反応を使い分けしているという事実は大変興味深い。

2. 発酵液に溶解する CO_2 の量

発酵液から気体の CO_2 が発生していることから、発酵液は CO_2 で飽和していると考えられる。ヘンリーの法則により、 CO_2 の溶解度は発酵液の量 (水はスクロースの加水分解で失われたり、温められて気化したりと減少するが、ここでは調整時の水の量で近似する) と前半競技終了時の発酵液の温度、 CO_2 分圧に依存すると考えられる。 CO_2 分圧は大気圧と測定した CO_2 濃度から計算できる。

3. 濃度測定のための CO_2 の希釈方法

ガス採取器による気体採取量が 50 mL 、 CO_2 検知管による濃度測定範囲が $5 \sim 50\%$ であること、シリンジに捕集した CO_2 が高濃度 (少なくとも 50% 以上) であろうという3点を勘案すれば、希釈の方法が見えてくる。

例えば、シリンジに捕集した気体 (CO_2) が 30 mL 未満であれば、シリンジは最大 60 mL 捕集できるから、ピストンを引いて同じ体積以上の空気を吸い込めば検知管が測定可能な 50% 未満の濃度に希釈できる。ただし、希釈後の体積は気体採取量である 50 mL は確保する必要がある。

捕集した気体 (CO_2) が 30 mL より多い場合は、少なくとも 30 mL になるまでシリンジ内の気体 (CO_2) を押し出して、前述と同様の操作をすれば 50% 未満に希釈できる。

以上の考察をもとに、本競技の実験データから、発酵により発生した CO_2 の物質量 (mol) と生成したエタノールの質量 (g) を求めるシートを作成すると、7 ページの例のようになる。表計算ソフトを用いてシートを作成し、各自測定データを入力して確認するとよい。

【考察問題の解答例と解説】

解答例

問1 「おいしい水 六甲」にはミネラル成分 (ナトリウム、カルシウム、マグネシウムなど) が含まれているが、「南極大陸上の氷を融かした水」には含まれていない。

問2 南極大陸上の氷は(空から降ってきた)雪が固まったので、「南極大陸上の氷を融かした水」は(蒸留水のように) 純水になるが、「おいしい水 六甲」は地層中のミネラル成分が溶け込んでいるから。

問3 「おいしい水 六甲」

問4 酵母の増殖には、細胞内のミネラル (イオン) として、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などが必須である。「南極大陸上の氷を融かした水」にはミネラルがきわめて低いのに対し、「おいしい水 六甲」には含まれているから。

問5 窒素 (N) とリン (P)

問6 増殖に必須のタンパク質, 核酸, リン脂質を合成するために必要であり, かつ, ショ糖を「おいしい水 六甲」に溶かした培養液にはあまり含まれていないものは窒素 (N) とリン (P) であるから。

解説

酵母の増殖には, タンパク質, 核酸, 脂質, 糖, そして細胞内のミネラル(イオン)として, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} などが欠かせない。そのため, 培養液にはこれらの成分が含まれていなければならない。

「おいしい水 六甲」と「南極大陸上の氷を溶かした水」を比較すると, 問2の解答例のように, 後者の水に含まれるミネラルがきわめて低いため, 培養には向かない。また, 前者の水には, 細胞増殖に必須のタンパク質, 核酸, そして生体膜成分であるリン脂質に含まれる元素である, 窒素 (N) やリン (P) は十分に含まれていない。そこでそれらを補給することで増殖を盛んにすることができる。タンパク質にはイオウ (S) や鉄 (Fe) をはじめとする金属も含まれているが, 問題では最も重要な元素を2つと問うているので, 窒素 (N) とリン (P) を正解とする。なお, 実際の酵母を培養するための培地には, アミノ酸やペプトン(タンパク質の分解産物), ビタミン類, リン酸塩などを含むエキスが加えられている。

(参考)

南極の水の味 <http://www.nipr.ac.jp/science-museum/qa/snow.html>

南極大陸上の氷の成分表示 http://www.asahiinryo.co.jp/products/water/oishiimizu_rokkou/

【最後に】

本競技は酵母菌によるアルコール発酵の定量化を試みる実験・考察競技であったが, 微生物という生き物を扱う競技である以上, 絶対的な正解は存在しない。

しかし, 実技競技である以上, 何らかの評価をする必要がある。そこで, 本競技では, 事前の準備とともに, 気体捕集量や CO_2 の濃度などの実験結果, 得られたデータを論理的に分析・計算し, 考察する力, それらをレポートにまとめて表現する力などを総合的に評価した。

皆さんが本競技を通じて学んだことや得たことは様々あると思うが, それらを糧として, 皆さん一人ひとりが今後ますます意欲的に学ばれんことを願っている。また, 併せて, 実験や考察することの面白さや楽しさを, 皆さんの仲間や後輩たちに伝えていって欲しいと思う。

※ 本競技で使用したガス採取器および CO_2 検知管は, 光明理化学工業株式会社のご支援を受けています。競技終了後, ガス採取器は各チームに贈呈されます。

「灘の酒」 実験データ計算シート (例)

既知データ

実験時の室温 (°C) (≡ CO ₂ 希釈時の気体の温度)	t	$0^{\circ}\text{C} = 273.15\text{K}$
実験時の気圧 (Pa)	P	$1\text{atm} = 1.013 \times 10^5\text{Pa}$
気体定数 R (Pa · L / (K · mol))	8.31×10^3	
理想気体の標準状態におけるモル体積 (L/mol)	22.4	
温度 T_f (°C) における CO ₂ の溶解度 (mL)	s	s は 1atm の CO ₂ が水 1 mL に溶ける体積 (mL) を標準状態に換算した値
エタノールの分子量	46	

測定データ

発酵液	1	水の体積 (mL)	m		「おいしい水 六甲」 80mL 以下
	2	乾燥酵母の質量 (g)		1.0	
	3	スクロースの質量 (g)			30g 以下
	4	試験管上部の空気層の高さ (mm)	h		
	5	試験管上部の空気の体積 (mL)	a		$a = \pi(r^2 - r'^2) \times h/10$ 試験管 $r = 1.4\text{cm}$ 、温度計 $r' = 0.3\text{cm}$ ただし、チューブ内の空気は無視している。
発酵条件	6	発酵開始時の温度 (°C)			
	7	発酵終了時の温度 (°C)	T_f		
	8	発酵時間 (分)			
気体捕集量	9	シリンジ1の捕集量 (mL)	V_1		シリンジ1は最初に気体を捕集したシリンジ
	10	シリンジ2以降の捕集量合計 (mL)	V_2		シリンジ2は付け替えたシリンジ
	11	捕集量合計 (mL)	V		$= V_1 + V_2$
CO ₂ の希釈	12	シリンジ1の希釈元の CO ₂ の体積 (mL)	V_c		$V_c \leq 30\text{mL}$
	13	希釈後の全体積 (mL)	V_t		$50\text{mL} \leq V_t \leq 60\text{mL}$
	14	CO ₂ 検知管の読み (%)	C_g		
	15	シリンジ2の希釈元の CO ₂ の体積 (mL)	V_c'		$V_c \leq 30\text{mL}$
	16	希釈後の全体積 (mL)	V_t'		$50\text{mL} \leq V_t \leq 60\text{mL}$
	17	CO ₂ 検知管の読み (%)	C_g'		
C ₂ H ₅ OH	18	アルコールセンサーの読み (mg/L)			

CO ₂ 濃度と物質質量	19	シリンジ1の実際の CO ₂ 濃度 (%)	C		$= C_g (V_t / V_c) \times (V_1 / (V_1 - a))$
	20	シリンジ1の全 CO ₂ の物質質量 (mol)	M_g		$= P (V_1 \times C \times 10^{-2}) \times 10^{-3} / R (273 + t)$
	21	シリンジ2の実際の CO ₂ 濃度 (%)	C'		$= C_g' (V_t' / V_c')$
	22	シリンジ2以降の全 CO ₂ の物質質量 (mol)	M_g'		$= P (V_2 \times C' \times 10^{-2}) \times 10^{-3} / R (273 + t)$
	23	発酵液に溶解した CO ₂ の物質質量 (mol)	M_s		$= P \times C' \times 10^{-2} \times s \times m / (1.01 \times 22.4 \times 10^8)$
	24	発酵で発生した CO ₂ の物質質量 (mol)	M		$= M_g + M_g' + M_s$
C ₂ H ₅ OH	25	発生した CO ₂ から求めた生成量 (g)			$= M \times 46$