# ＴＴＣを用いた呼吸の実験

## －視覚でとらえるアルコール発酵とクエン酸回路－

川島　政吉

今回の実験は，酵母菌が行うアルコール発酵とクエン酸回路を，二酸化炭素の発生とデヒドロゲナーゼと共役して還元されるTTCの色の変化（TTC+2H⁺→TPF+HCl）によって，同時に視覚的に捕らえるようにしたものである。また，酵母菌が嫌気呼吸であるアルコール発酵と好気呼吸であるクエン酸回路の両方を行えること，さらに解糖系とクエン酸回路の存在を確認することが可能である。

［キーワード］キューネ発酵管，TTC，アルコール発酵，クエン酸回路，デヒドロゲナーゼ，酵母菌

### はじめに

小学生の頃から呼吸とは，動物が行う呼吸運動を指している。中学・高校から，呼吸については，生物が細胞内で，有機物を異化して生活活動に必要なエネルギーを作り出すことを指すようになり，複雑さのためか理解されにくい。

そこで呼吸の実験を工夫することによって，生徒が呼吸によるエネルギー獲得のしくみを，視覚的に捕らえ簡単に理解できることが目標である。また，TTCを使うことでデヒドロゲナーゼの働きを簡単にとらえることも可能である。

アルコール発酵とクエン酸回路におけるTTCの反応と二酸化炭素の発生の関係は図１のようになっている。

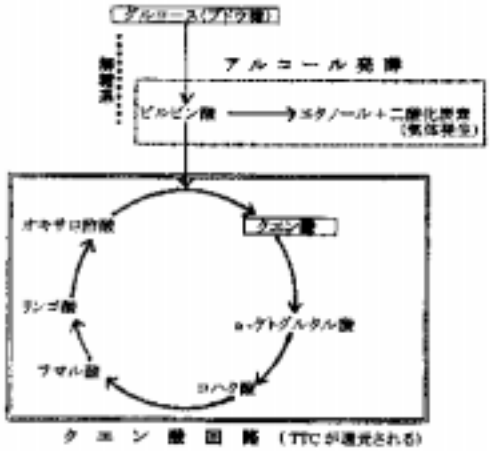


**図１　アルコール発酵とクエン酸回路**

### ＴＴＣを用いた呼吸の実験

**準　備**

キューネ発酵管，乾燥酵母，0.02M TTC溶液，0.3Mブドウ糖溶液，0.3Mクエン酸三ナトリウム溶液，メスシリンダー，試験管，ピペット

**方　法**

(1) ブドウ糖溶液11cm³とTTC溶液１cm³を試験管に取り反応液Ａとする。
(2) クエン酸三ナトリウム溶液11cm³とTTC溶液１cm³を試験管に取り反応液Ｂとする。
(3) 水11cm³ とTTC溶液１cm³ を試験管に取り反応液Ｃ（対照実験Ｃ）とする。
(4) 水11cm³ とTTC溶液１cm³ を試験管に取り反応液Ｄ（対照実験Ｄ）とする。
(5) 乾燥酵母７gを水20 cm³ に溶かした後，水を加え25cm³ としたものを酵母混濁液とし，室温に置いたこの酵母混濁液を３本のキューネ発酵管にそれぞれ６cm³ 入れる。
(6) 残りの酵素混濁液は，一度加熱してから室温に置き，この酵母混濁液をキューネ発酵管に入れる。
(7) 反応液Ａ，Ｂ，Ｃを加熱してない酵母混濁液の入ったそれぞれの発酵管の盲管部に気泡が入らないようにして満たす。
(8) 反応液Ｄを一度加熱した酵母混濁液の入った発酵管の盲管部に気泡が入らないように満たす。

(9) 発酵管の盲管部にたまる二酸化炭素の量と反応液の色の変化を５分おきに記録する。

**結　果**

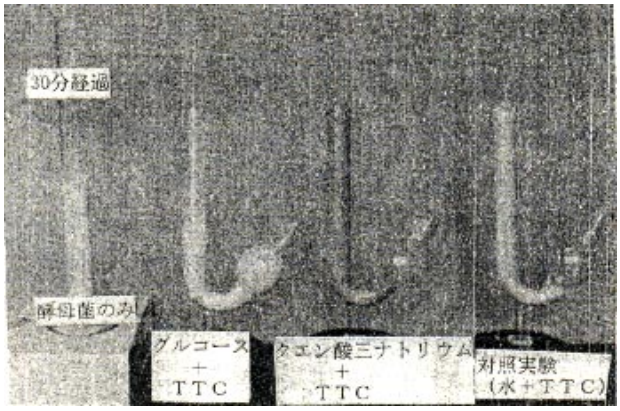


**図２　キューネ発酵管による反応の様子**

**表　反応液の変化（室温２１℃）**

| | 気体の発生 | 色の変化 TTC |
|---|---|---|
| 反応液Ａ | 30分後10cm³ | 薄いピンク |
| 反応液Ｂ | 発生しない | 濃いピンク |
| 対照実験Ｃ | 発生しない | 薄いピンク |
| 対照実験Ｄ | 発生しない | 白色のまま |

**考察および留意点**

TTCの還元が対照実験Ｃでもわずかに起きたのは，元々酵母菌にあった基質によるものと思われる。このことは，加熱した酵母菌（対照実験Ｄ）で同じように実験した結果，還元が起きなかったことから推測される。また，キューネ発酵管内では好気呼吸が少ないことも推測される。クエン酸三ナトリウム以外の基質を与えることで,生徒にいろいろ呼吸について考えさせ,発展させることができる実験である。

発酵管には，盲管部の容量に異なるものがあるので，入れる液量を変える必要がある。

**参　考**

(1)ＴＴＣ溶液とは,無色のテトラゾリウム塩（2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride)の溶液である。これは，酸素呼吸の盛んな細胞に浸透するとミトコンドリアで還元され赤色の脂溶性のＴＰＦ(Triphenylformazan：フォルマザン）と（図３）なる。

この性質を利用するとメチレンブルーのように空気中で酸化され脱色されることがないので利用しやすい。

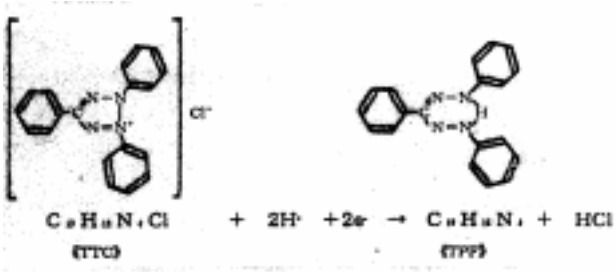


**図３　TTCの還元反応**

(2) ペトリ皿中に同量のTTC溶液とクエン酸三ナトリウム溶液とpH7～8のリン酸緩衝液を入れ反応液をつくる。その中に発芽種子（大豆など）を入れ，しばらくするとデヒドロゲナーゼの働きの強い部分（呼吸の盛んな部分など）が濃い赤色になり確認できる。

**参考文献**

松田仁志（1994）　固定化酵母を用いた呼吸の実験．生物教育．34巻（４号）：292－297.

（かわしま　まさよし　生物研究室研究員）