

タンパク質の変性の教材開発

加藤 良一

地域教育文化学部 児童教育コース

東海林 知佳

地域教育文化学部 食環境デザインコース

長根 智洋

北海道教育大学 教育学部 釧路校

(平成29年9月28日受理)

要 旨

試料(調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳)を500mlのビーカーに100ml、300mlのビーカーに60ml、または100mlのビーカーに20mlそれぞれ入れて、沸騰し始めまで電子レンジで加熱した後それらを冷ますと、全ての液面にタンパク質が凝固した皮膜が得られた。硫酸アンモニウム80%飽和区分になるように、試料に硫酸アンモニウムを加えて溶かすと、それらが入ったビーカーの縁に固まったタンパク質が付着した。つぎに、それらを10,000xg、3,000xg、1,000xg、300xg、または100xgで3分間遠心分離すると、全てにおいてタンパク質が液面の上部に集まった。試料をpH3.0、pH6.0、またはpH9.0の20mM Buffer中に入った状態にすると、pH3.0のBufferのときにだけタンパク質が凝固した。このようにして、タンパク質の変性を簡単な実験で提示できる新たな教材が提唱された。

I はじめに

タンパク質は、20種類のアミノ酸が多数結合してできていて、生体を構成する物質の中で重要なものである¹⁾。また、生体内の化学反応に関わる酵素もタンパク質でできている¹⁾。タンパク質は、構成するアミノ酸の種類、その数、およびその配列順序によって一次構造が決まり、水素結合、ジスルフィド結合、疎水性結合、およびイオン結合によってその高次構造が維持されている²⁾。タンパク質は、加熱、酸処理、塩基処理、有機溶媒の添加、または重金属イオンの添加などによって凝固する²⁾。これをタンパク質の変性と言い、二次構造以上の高次構造が変化してその生理活性を失う。また、タンパク質の水溶液に多量の塩を加えるとタンパク質は沈殿する²⁾。これは塩析と呼ばれ、タンパク質の変性の1つである²⁾。

高等学校の「生物」の教科書では、高温³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、極端なpHにさらす³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、アルコールの作用⁵⁾、またはある種の重金属の存在⁶⁾によってタンパク質が変性すると記載されているが、実際にタンパク質を変性させる実験例は取り上げていない。

タンパク質の変性に関わるような実例としては、以下の報告がある。岡本（1967）は、豆乳または10%タンパク質溶液を徐々に加温して、その液面に皮膜の生成が始まる温度は60℃付近であることを示した⁷⁾。また、その皮膜の生成には、液面での蒸発が行われていることが必要であることも示した⁷⁾。青木（1970）は、脱脂した大豆に水を加えて常温で1時間攪拌しながら抽出したタンパク質溶液を試料にして、硫酸アンモニウムの飽和濃度の33%の濃度になるようにそのタンパク質溶液に硫酸アンモニウムを加えて溶かし（硫酸33%飽和区分）、このときそのタンパク質溶液を加熱しない場合はその溶液中の約30%のタンパク質が塩析されたのに対し、そのタンパク質溶液を90℃で5分間の加熱した場合はその溶液中の約70%のタンパク質が塩析されたことを明らかにした⁸⁾。白川（1986）は、呉（水に浸した大豆をひき潰して乳状にしたもの）をろ過後にpH5.5以下にするとこの中のタンパク質は沈殿したが、それをpH6.0以上にするとタンパク質は沈殿せず、豆乳の場合はそれをpH5.8以下にするとタンパク質が沈殿することを示した⁹⁾。

また、実際に大豆から豆腐を作成し、これを教材として取り上げている例には以下の報告があり、豆腐を作成するにはタンパク質の変性が起こっている。前田（2001）は、呉を泡立つまで加熱してそれを木綿布でかたく搾って豆乳を作り、その豆乳を90℃まで再び加熱した後火を止めて、それが約80℃に下がったらそこに天然にがり、硫酸カルシウム、またはグルコノデルタラク톤を加えて凝固させ豆腐を作った¹⁰⁾。山下ら（2001）は、呉を煮沸させてそれを布で搾り75℃まで冷めてからそこに凝固剤を加えて豆腐を作る際に、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、硫酸カルシウム、または硫酸マグネシウムは凝固剤として働いたが、炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、または塩化カリウムを用いると凝固しなかったことを示した¹¹⁾。また、このときレモン汁または酢を用いても凝固することが分かった¹¹⁾。西川ら（2016）は、豆腐を作るときに硫酸カルシウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、または天然にがりそれぞれ凝固剤にすると、塩化カルシウムを用いた場合はその凝固速度が比較的速いことを明らかにした¹²⁾。

本研究では、大豆から呉を調整することを省略して、豆乳をスーパーマーケットなどで容易に安価で入手し、その豆乳および同様に入手した牛乳を試料に用いた。それらを加熱、塩析、またはpH変化の簡単な操作によって、タンパク質の変性を一目で生徒に認識できる教材を開発した。ただし、このとき最終的に豆腐を作ることにはこだわらなかった。また、本研究は、現行の高等学校学習指導要領生物領域の「生命現象と物質」において、「生命現象を支える物質の働きについて観察、実験などを通して探究し、タンパク質や核酸などの物質の働きを理解させ、生命現象を分子レベルでとらえさせる。」と記載された部分¹³⁾に該当する実験例であり、湯葉、豆腐、およびヨーグルトなどの食品加工に関連する応用面にもつながり、この実験例を示す有用性は高いと言えるだろう。

II 研究方法

1. 試料の入手および準備

調整豆乳（キッコーマン調整豆乳、200ml入り、キッコーマン飲料(株)、無調整豆乳（キッコーマンおいしい無調整豆乳、200ml入り、キッコーマン飲料(株)、および牛乳（おいしいサンコー 3.6牛乳、1リットル入り、(株)サンコー食品）は、山形市内のスーパーマケッ

トで購入した。そして、冷蔵庫に入れて保存しておいた調整豆乳、無調整豆乳、および牛乳は、封を切らないでパックに入った状態で、25℃前後の水に2時間以上それぞれ浸して、実験前にそれら試料の温度を約20℃にしておいた。

2. 加熱

試料（調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳）を、500mlのビーカーには100ml、300mlのビーカーには60ml、または100mlのビーカーには20mlそれぞれ入れた。それらを個別に電子レンジ（東芝 ER-511K、定格高周波出力500W）にセットし、試料が100mlの場合は約2分間、試料が60mlの場合は1分10秒前後、または試料が20mlの場合は42秒前後それぞれ加熱すると、それらの試料の液面が泡立ち沸騰し始めた。その時点で電子レンジを止め、そこから試料を電子レンジの外に出して少しずつ冷まし、液面をピンセットでつまんで、皮膜が形成されたかをそれぞれ確かめた。さらに、その皮膜を全て液面から引き上げて、そこに付着した試料をペーパータオルでふき取ってから、皮膜の生重量を電子天秤（ザルトリウス(株) CP622)を用いて測定した。

3. 塩析

10mlビーカーに試料4mlおよび硫酸アンモニウム2.4g、または試料8mlおよび硫酸アンモニウム4.8gを入れて（硫酸80%飽和区分）、スターラーで10分間攪拌し硫酸アンモニウムを溶かした。そして、そのビーカーの縁に固まったタンパク質が付くのか確かめた。つぎに、それらをエッペンドルフチューブに1mlそれぞれ入れ、遠心分離機（IWAKI Micro Centrifuge CFM-1300）を用いて、10,000xg（11,500rpm）、3,000xg（6,200rpm）、1,000xg（3,100rpm）、300xg（1,950rpm）、または100xg（1,150rpm）の遠心加速度で3分間それぞれ遠心分離した。

4. pH変化

試験管に200mMクエン酸Na Buffer（pH3.0）、200mM K-リン酸Buffer（pH6.0）、または200mMホウ酸Na Buffer（pH9.0）を0.4ml入れておき、その中に試料をそれぞれ3.6ml勢いよく入れ、1分間静置した。牛乳の場合は、つぎにそれらをエッペンドルフチューブに1ml入れ、遠心分離機を用いて10,000xgで3分間遠心分離した。

10mlビーカーに200mMクエン酸Na Buffer（pH3.0）を0.8mlおよび牛乳を7.2ml入れて、スターラーで3分間攪拌した。それをエッペンドルフチューブに1ml入れ、遠心分離機を用いて10,000xg、3,000xg、1,000xg、300xg、または100xgで3分間それぞれ遠心分離した。

Ⅲ 結果

試料（調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳）を上記Ⅱの2、3、または4のように処理して、タンパク質が変性して固まるのかをそれぞれ確認した。



図1 豆乳を加熱した後に皮膜が形成された様子
300mlビーカーに60mlの調整豆乳を入れ、電子レンジで1分12秒間加熱した。



図2 牛乳を加熱した後に皮膜が形成された様子
100mlビーカーに20mlの牛乳を入れ、電子レンジで41秒間加熱した。

1. 加熱

調整豆乳を500mlのビーカーに100ml、300mlのビーカーに60ml、または100mlのビーカーに20mlそれぞれ入れ、液面が泡立つまで電子レンジを用いて加熱した後、電子レンジから取り出して冷ますと、全ての液面にタンパク質の固まった皮膜が形成された(図1)。調整豆乳100ml、60ml、または20mlから、それぞれ1.64g、0.77g、または0.49gの皮膜が得られ、調整豆乳の液量が多くなるほどに皮膜の生重量も多くなった。なお、試料に無調整豆乳を用いて同様に加熱すると、これと全く同じ結果となった(データは示さない)。

牛乳を500mlのビーカーに100ml、300mlのビーカーに60ml、または100mlのビーカーに20mlそれぞれ入れ、同様に電子レンジで加熱した後取り出して冷ますと、全ての液面にタンパク質の固まった皮膜が形成された(図2)。牛乳100ml、60ml、または20mlから、それぞれ1.13g、0.71g、または0.2gの皮膜が得られ、牛乳の液量に依存して皮膜も多くなった。

2. 塩析

硫酸アンモニウムの飽和濃度の80%の濃度になるように調整豆乳に硫酸アンモニウムを加えて溶かすと(硫酸80%飽和区分)、それらが入ったビーカーの縁に調整豆乳のタンパク質が固まって付いた(図3A)。つぎに、それらを10,000xgで3分間遠心分離すると、タンパク質の固まりが液面の上部に集まった(図3B)。さらに、それらを10,000xg、3,000xg、1,000xg、300xg、または100xgでそれぞれ遠心分離すると、全てにおいてタンパク質は上方に集積した。そして、その遠心加速度が大きいほど集積したタンパク質は薄くなった(図3C)。なお、試料として無調整豆乳を用いて同様に硫酸アンモニウムを加えて溶かすと、これらと全く同じ結果となった(データは示さない)。

硫酸80%飽和区分になるように、牛乳に硫酸アンモニウムを加えて溶かすと、それらが入ったビーカーの縁に固まったタンパク質が付着した(図4A)。つぎに、それらを10,000xgで3分間遠心分離すると、タンパク質が液面の上部に集まった(図4B)。さらに、それらを10,000xg、3,000xg、1,000xg、300xg、または100xgでそれぞれ遠心分離すると、全てにおいてタンパク質は上方に集まり、その遠心加速度の大きさに依存してタンパク質はより薄くなった(図4C)。



図3 豆乳を硫酸80%飽和区分で塩析した様子

A: 10mlビーカーに調整豆乳 4 mlおよび硫酸アンモニウム2.4gを入れて (硫酸80%飽和区分)、スターラーで10分間攪拌し硫酸アンモニウムを溶かした。左は硫酸アンモニウムを入れ、右はそれを入れない対照区である。

B: Aをエッペンドルフチューブに1 mlそれぞれ入れ、10,000xgで3分間遠心分離した。左は硫酸アンモニウムを入れた場合、右はそれを入れない対照区である。

C: 10mlビーカーに調整豆乳 8 mlおよび硫酸アンモニウム4.8gを入れてスターラーで10分間攪拌した後、それをエッペンドルフチューブに1 mlそれぞれ入れ、3分間遠心分離した。左から、10,000xg、3,000xg、1,000xg、300xg、または100xgでそれぞれ遠心分離した後の様子である。



図4 牛乳を硫酸80%飽和区分で塩析した様子

A: 10mlビーカーに牛乳 8 mlおよび硫酸アンモニウム4.8gを入れて (硫酸80%飽和区分)、スターラーで10分間攪拌し硫酸アンモニウムを溶かした。左は硫酸アンモニウムを入れ、右はそれを入れない対照区である。

B: Aをエッペンドルフチューブに1 mlそれぞれ入れ、10,000xgで3分間遠心分離した。左は硫酸アンモニウムを入れた場合、右はそれを入れない対照区である。

C: 10mlビーカーに牛乳 8 mlおよび硫酸アンモニウム4.8gを入れてスターラーで10分間攪拌した後、それをエッペンドルフチューブに1 mlそれぞれ入れ、3分間遠心分離した。左から、10,000xg、3,000xg、1,000xg、300xg、または100xgでそれぞれ遠心分離した後の様子である。

3. pH変化

20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 中では調整豆乳および無調整豆乳のタンパク質は明確に固まったが、20mM K-リン酸Buffer (pH6.0) および20mM ホウ酸Na Buffer (pH9.0) 中ではそれらのタンパク質は全く固まらなかった (図5)。

牛乳のタンパク質は20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 中で小さな粒状にはなったが、豆乳の結果と比較してその凝固を明確に捉えることはできなかった。一方、20mM K-リン酸Buffer (pH6.0) および20mM ホウ酸Na Buffer (pH9.0) 中では牛乳のタンパク質は全く固まらなかった。つぎに、それらを10,000xgで3分間遠心分離すると、20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 中でタンパク質は固まりとなって沈殿したが、20mM K-リン酸

Buffer (pH6.0) および20mM ホウ酸Na Buffer (pH9.0) 中でそれは沈殿しなかった (図 6 A)。さらに、20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 中の牛乳を10.000xg、3.000xg、1.000xg、300xg、または100xgでそれぞれ遠心分離すると、全てにおいてタンパク質は沈殿した (図 6 B)。しかし、その遠心加速度が小さいほど、タンパク質の沈殿物は大きくなり、その上清はより白濁して、タンパク質の凝固が分かりにくくなった。(図 6 B)。

なお、牛乳の主なタンパク質はカゼインであり、それは牛乳中でコロイド状に分散していて、カゼインミセルと呼ばれている¹⁴⁾。牛乳をpH低下にすると固形分が凝固するのは、カゼインミセル表面のマイナス電荷が減少してカゼインミセル同士の反発力がなくなりやがてそれらがミセル会合体を形成することであり¹⁵⁾、このときカゼインタンパク質の高次構造はほとんど変化せず、すなわち正確に言えばタンパク質の変性ではないとも言える。しかし、このときカゼインミセル表面に存在する κ -カゼインのC末端部分のペプチドの高次構造が変化して立体的安定性が消失する¹⁵⁾ こと、さらにカゼインタンパク質が集まってより大きな会合

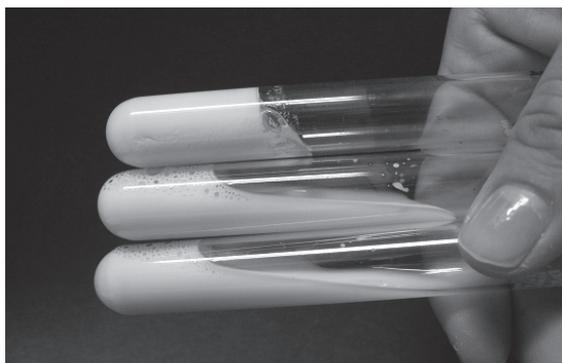
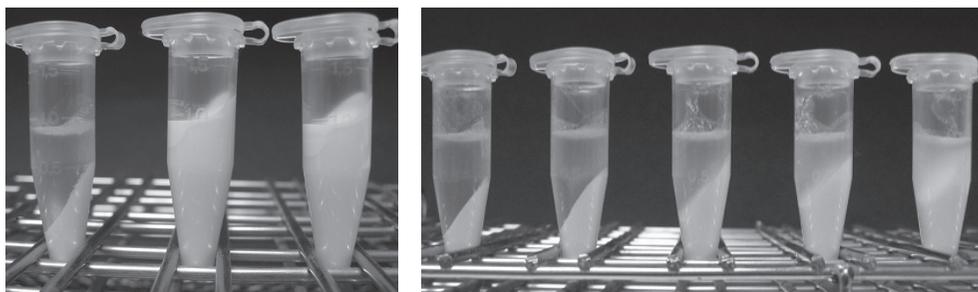


図5 豆乳を各pHのBufferに入れた後の様子

上：試験管に200mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) を0.4mlおよび調整豆乳を3.6ml入れ、1分間静置した後の様子を示す。
中：試験管に200mM K-リン酸Buffer (pH6.0) を0.4mlおよび調整豆乳を3.6ml入れ、1分間静置した後の様子を示す。
下：試験管に200mM ホウ酸Na Buffer (pH9.0) を0.4mlおよび調整豆乳を3.6ml入れ、1分間静置した後の様子を示す。



A

B

図6 牛乳を各pHのBufferに入れてから遠心分離した後の様子

A左：試験管に200mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) を0.4mlおよび牛乳を3.6ml入れ、1分間静置した。それをエッペンドルフチューブに1ml入れ、10.000xgで3分間遠心分離した。A中：試験管に200mM K-リン酸Buffer (pH6.0) を0.4mlおよび牛乳を3.6ml入れ、1分間静置した。それをエッペンドルフチューブに1ml入れ、10.000xgで3分間遠心分離した。A右：試験管に200mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) を0.4mlおよび牛乳を3.6ml入れ、1分間静置した。それをエッペンドルフチューブに1ml入れ、10.000xgで3分間遠心分離した。

B：10mlビーカーに200mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) を0.8mlおよび牛乳を7.2ml入れ、スターラーで3分間攪拌した後、それをエッペンドルフチューブに1mlそれぞれ入れ、3分間遠心分離した。左から、10.000xg、3.000xg、1.000xg、300xg、または100xgでそれぞれ遠心分離した後の様子である。

体を形成する¹⁵⁾ (拡大解釈してタンパク質の四次構造の変化に近い現象と考えた) ことから、本研究では、牛乳のpHを下げると凝固することを広い意味でタンパク質の変性と解釈した。

IV 考 察

生命体を構成しているタンパク質は、加熱、酸処理、塩基処理、有機溶媒の添加、または重金属イオンの添加などによって凝固し²⁾、これをタンパク質の変性と言う。高等学校の「生物」では、タンパク質の変性について学習はするが^{3) 4) 5) 6)}、実際にタンパク質を変性させる実験はしていないのが現状であろう。大豆から豆腐を実際に作成し、これを教材として取り上げている報告がいくつか^{10) 11) 12)}ある。しかし、最終的な工程で豆腐として固めるときには、加熱と塩析の両者を同時に行って、タンパク質を凝固させ、すなわちタンパク質を変性させている。

本研究では、スーパーマーケットなどで容易に入手できる豆乳および牛乳を試料に用いて、それらを加熱、塩析、またはpH変化のそれぞれ単独の操作によってタンパク質を凝固させ、タンパク質の変性を簡単に生徒に提示できる教材の開発を目指した。

試料を加熱する際に、ガスバーナーなどの炎を用いるのではなく、本研究では取り扱い上安全で簡便な電子レンジを用いることにした。そして、ビーカーに試料を入れて電子レンジで加熱するときに、ビーカーの容量一杯に試料を入れてしまうと、加熱後に電子レンジからビーカーを取り出すとき、手に触れるビーカーの箇所が熱くなりすぎ、また試料を加熱しすぎると、ビーカーの上部から試料が容易に溢れ出てしまうので、そうなることを扱う実験者(生徒)に火傷の危険が生じる。そこで、本実験では試料はそれぞれのビーカーの容量の1/5量とした。また、岡本(1967)が報告したように、豆乳を徐々に加温してその液面に皮膜が生成されるには、液面での蒸発が行われていることが重要なので⁷⁾、試料の液量に対する液面の面積を大きくして液面からの蒸発が盛んになるように工夫することからも、試料をビーカーの容量の1/5量とした。調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳を500mlのビーカーに100ml、300mlのビーカーに60ml、または100mlのビーカーに20mlそれぞれ入れて電子レンジで加熱すると、全ての液面にタンパク質が変性して凝固した皮膜が得られた(図1および2)。そして、それら試料の液量に依存して得られる皮膜も多くなった。実際にこれを教材として授業で取り上げるには、試料は調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳のどれを用いてもよいと思われる。また、実験者(生徒)にとって分かりやすい皮膜をなるべく多く得るためには、できるだけ試料の液量を多くすべきだが、用いるビーカーが大きすぎるとそれが電子レンジの中に入らないので、既設の電子レンジにギリギリ入るビーカーを選んで、その容量の約1/5量の試料をそこへ入れるようにすべきであろう。

硫酸アンモニウムは溶解度が大きく、温度による溶解度の違いが小さく、さらに2価の硫酸イオンを含むので塩析効果も大きいことから、これが塩析に最もよく使用される¹⁶⁾。そこで、硫酸80%飽和区分になるように、調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳に硫酸アンモニウムをそれぞれ加えて溶かすと、それらが入ったビーカーの縁に固まったタンパク質が付着した(図3Aおよび4A)。つぎに、タンパク質の変性による凝固を確認しやすいよ

うに、それらを10.000xgで遠心分離すると、タンパク質が液面の上部に集まった(図3Bおよび4B)。さらに、どの程度の遠心加速度を加えるとタンパク質の集積が確認できるか調べるために、それらを10.000xg、3.000xg、1.000xg、300xg、または100xgでそれぞれ遠心分離した。その結果、全てにおいてタンパク質は上方に集積した(図3Cおよび4C)。このことから、これを教材として授業で取り上げるには、試料は調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳のどれでも適していて、タンパク質の変性をさらに明確に示すためには、100xg以上でそれを遠心分離すればよいことが分かった。

遠心分離をする機材としては、エッペンドルフチューブを専用にした卓上小型遠心機が3万円前後からの価格で販売されており、その得られる最大遠心加速度は2.000xg程度である。また、手動式遠心機はその本体とローターを合わせて6万円程度で、その最大遠心加速度は1.000xgほどである。これらならば、現場の学校でも購入しやすいかもしれない。

豆腐を作るときに用いる塩化マグネシウムを使って、同様な塩析が起こるか確かめてみた。塩化マグネシウム約90%飽和区分になるように、約20℃の調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳に塩化マグネシウムをそれぞれ加えて溶かしたが、タンパク質の固まりは全く観察できなかつた(データは示さない)。塩化マグネシウムを使って豆乳のタンパク質を塩析によって固めるためには、実際に豆腐を作るように加熱も同時に行う必要がある¹¹⁾¹²⁾のだろう。

pH変化によってタンパク質が変性することを示すために、pH3.0、pH6.0、またはpH9.0の20mM Buffer中に調整豆乳または無調整豆乳が入った状態にすると、pH3.0のBufferのときにだけに明確にタンパク質が凝固し、このとき試験管を真横にしても固まった豆乳はその口から流れ出ないほどであった(図5)。同様に、pH3.0、pH6.0、またはpH9.0の20mM Buffer中に牛乳が入った状態にすると、pH3.0のBufferのときにだけにタンパク質が粒状に固まったように見えた。つぎに、このタンパク質の凝固を確認しやすいように、それらを10.000xgで遠心分離するとpH3.0のときタンパク質は固まりとなって沈殿した(図6A)。さらに、pH3.0におけるタンパク質の変性を確認するためにどの程度の遠心加速度が必要か調べると、その上清が白濁せずにタンパク質の沈殿が見やすいのは、1.000xg以上のときであった(図6B)。これらの結果から、pHを下げることでタンパク質を変性させる試料としては、牛乳よりも豆乳(調整豆乳または無調整豆乳)が適していて、豆乳では遠心分離をしないでも明確にタンパク質の凝固が確認できた。

現行の高等学校学習指導要領化学領域の「高分子化合物の性質と利用」において、「高分子化合物の性質や反応を観察、実験などを通して探究し、合成高分子化合物と天然高分子化合物の特徴を理解させるとともに、それらを日常生活や社会と関連付けて考察できるようにする。」と記載されていて¹³⁾、さらにその解説には「天然高分子化合物については、タンパク質、デンプン、セルロース、天然ゴムなどを取り上げ、その構造や性質を単量体との関係から扱う。〔中略〕ここで扱う実験としては、例えば、タンパク質やデンプンの性質を調べる実験などが考えられる。」と記載されている¹³⁾。本研究では、加熱で生じる皮膜のタンパク質の性質を調べる実験も提示され、これは生物分野におけるタンパク質の変性だけでなく、視点を変えることで化学分野における天然高分子化合物の例としても捉えることができ、この教材としての有用性は高いと言えよう。

2016年に中央教育審議会の答申により、幼稚園・小学校・中学校の学習指導要領が改訂の方向性が示された¹⁷⁾。高等学校においては、2017年度中に学習指導要領が改訂され、1年間の周知・徹底期間、3年間の移行期間を経たのちに、2022年4月より完全実施される予定である。その改訂に伴い、現行の「理科課題研究」が廃止され、「理数探究基礎（仮称）」および「理数探究（仮称）」が新設されることが決定している¹⁸⁾。本研究は、高等学校「生物」および「化学」における実験例としての有用性が高いだけでなく、「理数探究基礎（仮称）」および「理数探究（仮称）」のような教科・科目の枠にとらわれない多角的・複合的な視点で事象をとらえ、探究的な学習を行っていく科目においても応用していける可能性が高いであろう。

V まとめ

調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳を500mlのビーカーに100ml、300mlのビーカーに60ml、または100mlのビーカーに20mlそれぞれ入れて、それらの液面が泡立ち沸騰し始めまで電子レンジで加熱した後、それらを電子レンジの外に出して少しずつ冷まし、液面をピンセットでつまむと、全ての液面にタンパク質が凝固した皮膜が得られた。そして、それら試料の液量が多くなるほどに皮膜の生重量も多くなった。

10mlビーカーに調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳を4mlまたは8mlと、硫酸アンモニウム2.4gまたは4.8gをそれぞれ入れて（硫酸80%飽和区分）、スターラーで攪拌し硫酸アンモニウムを溶かすと、それらが入ったビーカーの縁にタンパク質が固まって付いた。つぎに、それらをエッペンドルフチューブに1mlそれぞれ入れ、遠心分離機を用いて10,000xgで3分間それぞれ遠心分離すると、タンパク質の固まりが液面の上部に集まった。さらに、エッペンドルフチューブに入れたそれら1mlを10,000xg、3,000xg、1,000xg、300xg、または100xgで3分間それぞれ遠心分離すると、全てにおいてタンパク質は上方に集積した。そして、その遠心加速度が大きいほど集積したタンパク質は薄くなった。

試験管に200mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)、200mM K-リン酸Buffer (pH6.0)、または200mM ホウ酸Na Buffer (pH9.0)を0.4ml入れておき、その中に調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳をそれぞれ3.6ml勢いよく入れ、1分間静置した。pH3.0の20mM Buffer中では、調整豆乳および無調整豆乳のタンパク質は明確に固まったが、牛乳のタンパク質は小さな粒状になった。また、pH6.0およびpH9.0の20mM Buffer中では、それらのタンパク質は全く固まらなかった。つぎに、pH3.0、pH6.0、またはpH9.0の20mM Buffer中の牛乳をエッペンドルフチューブに1mlそれぞれ入れ、遠心分離機を用いて10,000xgで3分間遠心分離した。その結果、pH3.0のBuffer中でタンパク質は固まりとなって沈殿したが、pH6.0およびpH9.0のBuffer中でそれは沈殿しなかった。さらに、10mlビーカーに200mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)を0.8mlおよび牛乳を7.2ml入れて、スターラーで3分間攪拌した。それをエッペンドルフチューブに1ml入れ、10,000xg、3,000xg、1,000xg、300xg、または100xgでそれぞれ遠心分離すると、全てにおいてタンパク質は沈殿した。しかし、その遠心加速度が小さいほど、タンパク質の沈殿物は大きくなり、より白濁した上清となった。

以上の結果から、高等学校「生物」の授業では、調整豆乳、無調整豆乳、または牛乳を試料にして、上記のような手法でその中に含まれるタンパク質を加熱、塩析、またはpH変化させてタンパク質を凝固させ、タンパク質の変性を簡単に生徒に提示することができ、これを新たな教材としてここに提唱できた。

引用・参考文献

- 1) 丸山工作 (1999)「生化学入門」裳華房pp. 8
- 2) 前野正夫、磯川桂太郎 (2008)「改訂第2版 はじめの一步のイラスト生化学・分子生物学」羊土社pp. 46
- 3) 浅島誠、ほか20名 (2014)「文部科学省検定済教科書 生物」東京書籍 pp. 20
- 4) 吉里勝利、ほか16名 (2014)「文部科学省検定済教科書 高等学校生物」第一学習社 pp. 42
- 5) 庄野邦彦、馬場昭次、ほか12名 (2015)「文部科学省検定済教科書 生物」実教出版 pp. 28
- 6) 嶋田正和、ほか11名 (2013)「文部科学省検定済教科書 生物基礎」数研出版 pp. 21
- 7) 岡本奨(1967)「ユバ状蛋白質皮膜の形成について」日本食品工業学会誌 14(4): 148-153
- 8) 青木宏(1970)「大豆タンパク質のゲル形成過程におけるタンパク成分変化の挙動」日本食品工業学会誌 17(4): 129-135
- 9) 白川武志(1986)「大豆タンパク質の加熱変性」香川県発酵食品試験場報告 78: 32-39
- 10) 前田昭彦(2001)「タンパク質の凝固—豆腐づくりを通して生活と化学を結びつける—」北海道立理科教育センター 研究紀要 13: 38-41
- 11) 山下絵美、広木正紀、村上忠幸 (2001)「豆腐づくりを教材化するための基礎的研究—豆腐のできる条件探しを中心に—」フォーラム理科教育 3:1-8
- 12) 西川和孝、柏木麻里、後藤昌弘、田中章江 (2016)「各種凝固剤を用いて調整した豆腐の比較と家庭科教材への活用」日本家政学会第68回大会 研究発表要旨集 pp. 58
- 13) 文部科学省(2009)「高等学校学習指導要領解説 理科編 理数編」pp. 70 pp84
- 14) 石井哲也(2005)「カゼインミセルの構造および性質に関する最近の研究動向」Milk Science 54(1):1-8
- 15) 仁木良哉 (2002)「牛乳酸性ゲルの特性」Milk Science 51(3): 111-120
- 16) 阿南功一、維野邦男、田村善蔵、松橋通生、松本重一郎 (1974)「基礎生化学実験法2 抽出・分離・精製」丸善 pp. 60
- 17) 中央教育審議会 (2016)「幼稚園、小学校、中学校、高等学校及び特別支援学校の学習指導要領等の改善及び必要な方策等について (答申)」
- 18) 文部科学省 (2016)「理数探究 (仮称) に関する資料 (平成28年4月13日教育課程部会高等学校の数学・理科にわたる探究的科目の在り方に関する特別チーム (第4回) 資料抜粋)」

Summary

Ryoichi Kato¹⁾, Chika Shoji²⁾, Tomohiro Nagane³⁾
Teaching materials of protein denaturation

The 100 ml, 60 ml, or 20 ml of the sample (prepared soybean milk, unprepared soybean milk, or milk) was put into a 500 ml, 300 ml, or 100ml beaker, respectively. These samples were heated to the beginning of boiling using a microwave oven and cooled. And then, a membrane which was composed of the proteins denatured and included in the samples was developed on the surface of the sample at all volumes of the sample. When ammonium sulfate was added and dissolved in the samples at 80 % concentration of the saturated solution, denatured proteins were absorbed on the glass surface of beaker which in ammonium sulfate solution were put. They were centrifuged at 10.000 xg, 3.000 xg, 1.000 xg, 300 xg, or 100 xg for 3 min. And denatured protein was accumulated upper of the solution at all centrifugations. When the sample was included in 20 mM buffers of pH3.0, pH6.0, or pH9.0, the proteins were denatured in the buffer of pH3.0 and did not denatured in other buffers.

- 1) Primary Education, Faculty of Education, Art and Science, Yamagata University
- 2) Food and Nutrition, Faculty of Education, Art and Science, Yamagata University
- 3) Hokkaido University of Education, Kushiro Campus