

ナタマメ粉末の未精製ウレアーゼによる尿素加水分解溶液の pH 緩衝作用

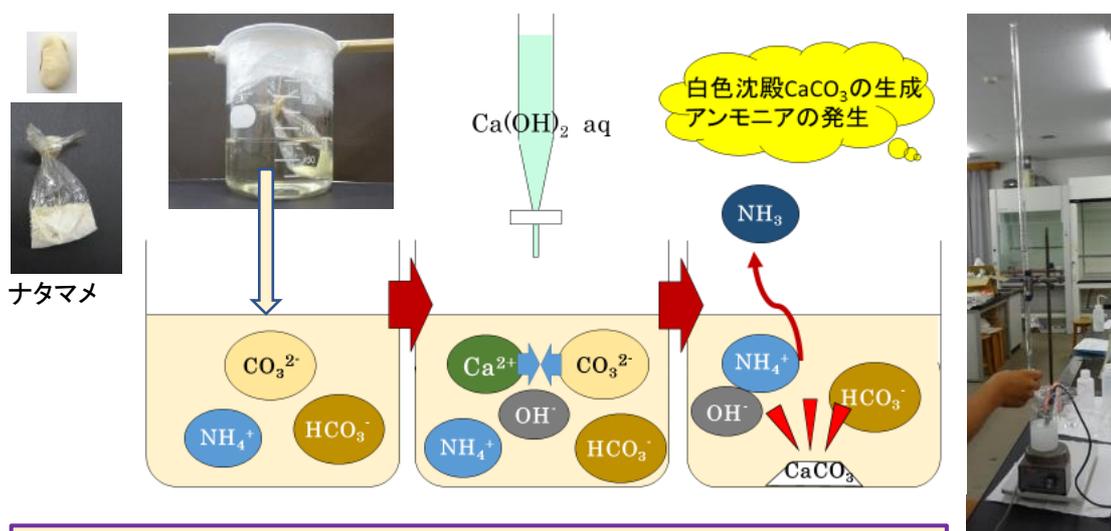
富山県立富山中部高等学校 (スーパーサイエンス部)

本郷巧望・中田隆誠・中瀬結衣

指導教員：浮田直美

研究概要

これまで、ナタマメやダイズ植物体の各部位に含まれるウレアーゼの熱安定性について調べてきたが、酵素活性の有無の判定は反応溶液の pH を測定することで行ってきた。その時に、多くの尿素-ウレアーゼ反応溶液は pH が 9.6 前後で一定の値であることに気がつき、pH 緩衝溶液になっているのではないかと考えた。未精製ウレアーゼとして白ナタマメ種子粉末をセロハン膜に入れ、1.6 mol/L の高濃度尿素水溶液中につるしておくことで、高分子の酵素ウレアーゼを含まず、基質の尿素がほぼ分解している pH 緩衝液が得られた。この反応溶液とこの溶液を 10 倍希釈した溶液に、それぞれ強塩基性の飽和水酸化カルシウム水溶液（石灰水）を多量に加えていくと、希釈していない高濃度溶液の pH は若干下がり、希釈した反応溶液の pH は若干上がったが、水酸化カルシウムを加える前の pH を保ち、ほぼ一定であった。水酸化カルシウムを加えると炭酸カルシウムの生成やアンモニアの発生、イオンや分子の平衡移動により pH が一定になると考えられる。



尿素とウレアーゼの反応溶液に飽和水酸化カルシウム水溶液を多量に加えていっても pH は 9.2～9.6 に保たれる

1. 背景と目的

ウレアーゼは尿素をアンモニアと二酸化炭素に加水分解する酵素で、ナタマメやダイズの未精製種子に高いウレアーゼ活性があることは知られているが、これまでの研究で、種子は乾燥状態であれば 100℃の高温でも完全には失活しないことや、葉、茎、莢などの通常廃棄してしまう部分にもウレアーゼが含まれており、植物全体を酵素供給体として利用できることがわかった。実験を行っている中で、尿素とこれら未精製ウレアーゼとの反応液は pH が 9.6 前後から変化しなかったため、pH 緩衝液になっているのではないかと考えた。近年、ウレアーゼによる尿素加水分解で生じた炭酸イオンと塩化カルシウムのカルシウムイオンを反応させ、生じる炭酸カルシウムにより土の強度を向上させる研究が進められている⁽¹⁾。塩化カルシウムは水に溶けやすいが、カルシウム源として用いると、塩化物イオン Cl⁻が供給され除去するのが難しい。そこで、水酸化カルシウムを用いて炭酸カルシウムを沈殿させることを考えた。ナタマメ粉末(未精製ウレアーゼ)と尿素との反応液に強塩基性の水酸化カルシウム水溶液を滴下していき、pH の変化を調べた。

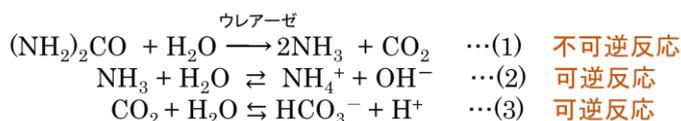


図 1 ウレアーゼによる尿素加水分解反応と溶液中に主に含まれるイオンと分子

2. 実験方法・結果・考察

【実験 1】 反応液に飽和 Ca(OH)₂ 水溶液(石灰水)を加えた時の pH 変化

【実験 1-1】 ウレアーゼ反応液(濃度の濃い溶液)の pH 変化

(方法)

- ① セロハン膜を水に浸けて密着している膜を開き、円筒状にして乾燥する。
- ② ①に白ナタマメ種子粉末 1.00g を入れ、両端を縛る。
- ③ 1.6mol/L 尿素溶液に②のマメ粉末パックを室温で 2 日間浸けて置く。
容器上部はパラフィルムで密閉する。…尿素分解反応溶液の調製
- ④ ①のセロハン外側の反応液だけをビーカーにとり、マグネティックスターラーで攪拌しながら飽和 Ca(OH)₂ 水溶液を 0.50mL ずつビュレットから滴下し、pH 計(PH/ORP 計 PH-02, 株式会社カスタム)で pH を測定する。

pH 測定に用いた反応液は、セロハン膜内でウレアーゼと尿素を反応させながら透析した外側の溶液なので、分子量の大きなウレアーゼは含まれていない。また、逆滴定で求めた反応液中の総アンモニア濃度から、少なくとも尿素の約 90%が加水分解されたと算出され、尿素濃度も低い。

(結果)



〔1回目〕 酵素反応期間：2020年11/3～11/5,
反応液(pH9.73)80mL ; Ca(OH)₂ aq (pH 12.6) 140mL
※1日目に測定した溶液をパラフィルムで密閉して室温で一晩置き、翌日も引き続き測定した

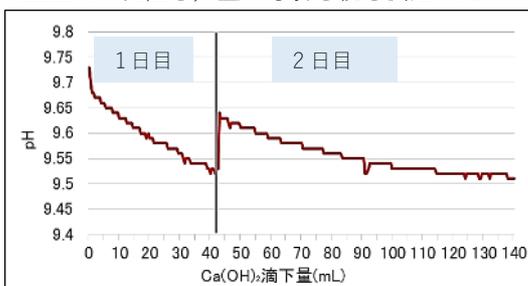


図 2 飽和 Ca(OH)₂ aq の滴下量と pH の変化 (1 回目)

〔2回目〕 酵素反応期間：2021年4/17～4/19
反応液(pH9.68) 50mL ; Ca(OH)₂ (pH 12.17) 100mL

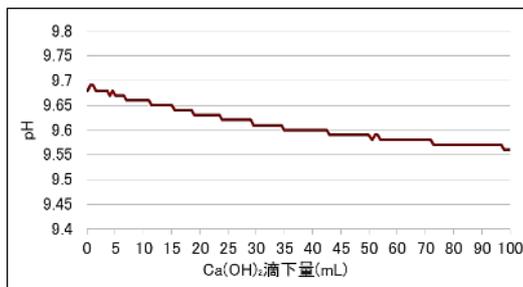


図 3 飽和 Ca(OH)₂ aq の滴下量と pH の変化 (2 回目)

強塩基の飽和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液を加え続けているにも関わらず、pH は上昇せずむしろ下がっていった。一晩置いておくと pH は少し上昇したが、飽和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液を再び滴下していくと、pH は下がっていった(図2)。最終的には 9.56~9.57 で一定になった(図2, 3)。

【実験 1-2】 10 倍希釈したウレアーゼ反応液(濃度の薄い溶液)の pH 変化
(方法)

- ① ウレアーゼ反応液(濃度の濃い溶液)を水で 10 倍希釈する(濃度の薄い反応溶液)
- ② ①の薄い反応液 80mL をビーカーにとり、マグネティックスターラーで攪拌しながら飽和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液を 0.50mL ずつビュレットから滴下し、pH 計で pH を測定する。

(結果)

濃いウレアーゼ反応液の場合とは異なり、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液の滴下とともに pH は上がっていったが、その変化は小さく、pH は 9.2~9.3 を示した(図4)。濃度の濃いウレアーゼ溶液と同様に、濃度の薄いウレアーゼ溶液でも pH 緩衝作用があるとわかった。

(考察)

ウレアーゼ反応液の濃度によらず、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ aq を滴下した時に pH 変化が小さく、ほぼ一定でなのはなぜだろうか。

pH9.8 の尿素とウレアーゼの反応液中では、 CO_2 の大部分は HCO_3^- になっている。

この反応液に $\text{Ca}(\text{OH})_2$ が加わると、 OH^- 濃度が高まるので式表 1 ②式の平衡が左に移動し、 NH_4^+ から NH_3 が発生する。同時に④式の平衡が右に移動し CO_3^{2-} が生じ、⑤式の反応が進み CaCO_3 が沈殿する。これら多成分の複数の平衡が移動することから、pH9.6 近くで緩衝作用が起きたと考えられる。

次に、 CO_2 で飽和した炭酸水 50mL に飽和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液を滴下して、pH 変化の様子をウレアーゼ反応液と比較した(表2)。

石灰水を 30mL 加えて pH が 7.55 になった

時、 CaCO_3 と推察される白い濁りが生じた。石灰水を 50mL 以上加えると強塩基性になった。そこで、60mL の石灰水を加えた後にウレアーゼ反応液 10mL を加えた。pH は 12.07 からウレアーゼ反応液の pH に近い 9.45 に下がったので、ウレアーゼ反応液の緩衝作用が強いことが確かめられた。炭酸水に pH 緩衝作用がなかったことから、ウレアーゼ反応液の pH 緩衝作用は酸としての NH_4^+ の寄与が大きかったのではないかと考えられる。

【実験 2】 反応液に CaCl_2 水溶液を加えた時の pH 変化

【実験 2-1】 ウレアーゼ反応液(濃度の濃い溶液)の pH 変化

(方法)

ウレアーゼ反応液 10mL をビーカーに入れ、0.10mol/L CaCl_2 aq を 1mL ずつマイクロピペットで滴下して、それぞれの溶液の pH 変化を測定する。

(結果)

CaCl_2 水溶液を加えると徐々に pH が下がったが(図5)、時間

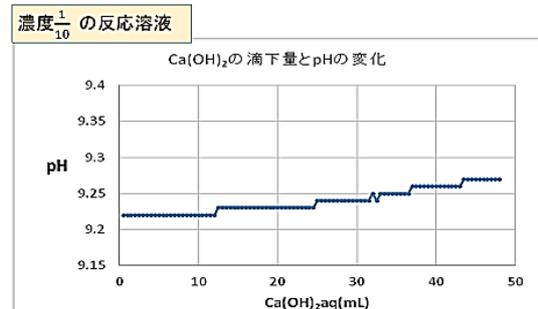


図4 飽和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ aq の滴下量と pH の変化

表1 ウレアーゼ反応液中の分子やイオンの電離定数(2)

$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 \dots$ ①ウレアーゼによる尿素の加水分解
$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \dots$ ② $K_b = 1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$
$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{H}_2\text{CO}_3) \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \dots$ ③ $K_{a1} = 4.2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$
$\text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+ \dots$ ④ $K_{a2} = 4.8 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$
$\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{CaCO}_3 \dots$ ⑤ 溶解度積 $K_{sp} = 4.8 \times 10^{-9} (\text{mol/L})^2$

表2 炭酸水に石灰水を加えた時の pH 変化

石灰水 (mL)	0	10	20	30	40	50	60
pH	4.17	6.15	6.94	7.55	8.15	11.14	12.07

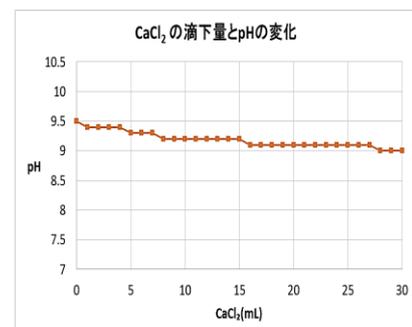


図5 CaCl_2 aq の滴下量と pH の変化

が経つと CaCl_2 を 30mL 滴下した溶液の pH は 9.0 から 9.2 に再び上昇した。

【実験 2-2】 10 倍希釈したウレアーゼ反応液（濃度の薄い溶液）の pH 変化

〈方法〉

- ① ウレアーゼ反応液（濃度の濃い溶液）を水で 10 倍希釈する（濃度の薄い反応溶液の調製）。
- ② ①の薄い反応液 10mL をビーカーに入れ、0.10mol/L CaCl_2aq を 1mL ずつマイクロピペットで滴下してそれぞれの溶液の pH 変化を測定する。

〈結果〉

1/10 濃度のウレアーゼ反応液に CaCl_2 を 30mL 滴下した溶液の pH は 7.2~7.4 で一定になった。
 CaCl_2aq を 30mL 滴下した後、さらに CaCl_2aq を 22.9mL 加えると、pH は 7.2 になった。この溶液にさらに強酸である 0.2mol/L の HClaq を 10mL 加えると pH は 6.6 に少し下がったが、液性はほぼ中性に保たれた。

〈考察〉

濃度の異なるウレアーゼ反応液に、 CaCl_2 を加えたそれぞれの pH で、いずれも複数の成分が平衡状態になっていると考えられる。

濃度の異なるどちらの反応液も、 CaCl_2 が加わった平衡状態になった後も pH 緩衝作用を示した。10 倍希釈したウレアーゼ反応液は希釈していない反応液に比べると、pH 変化は大きかったので（図 6）、10 倍希釈したウレアーゼ反応液と CaCl_2 水溶液をいろいろな割合で混ぜることで、異なる pH の pH 緩衝液を作ることができる可能性がある。

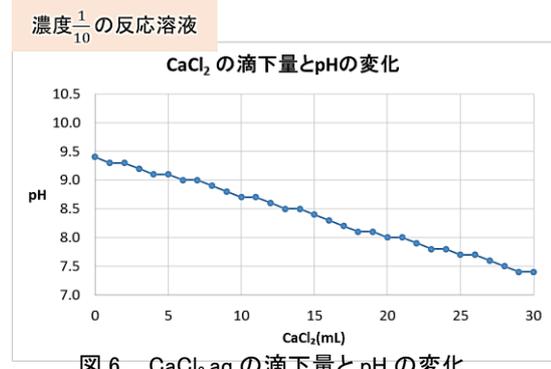


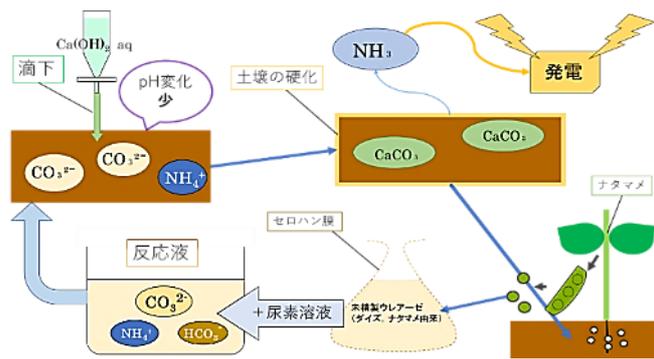
図 6 CaCl_2aq の滴下量と pH の変化

3. 結論

ナタマメの未精製ウレアーゼと尿素を反応させた溶液は、pH9.6 前後で一定値になり、強塩基性の飽和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液を多量に加えても pH は上昇しない。ウレアーゼと尿素の反応溶液が強い pH 緩衝作用を持つことは NH_4^+ と HCO_3^- 、 CO_3^{2-} の存在に起因する

4. 今後の課題と展望

ナタマメやダイズの未精製ウレアーゼと尿素を反応させた溶液に石灰水を加え、生じる炭酸カルシウムが地盤を固化させる効果があるか確かめたい。同時に生じるアンモニアをアンモニア燃料電池⁽³⁾などへ活用する方法も探っていきたい。



5. 参考文献

- (1) 安原英明, Neupane, D., 木下尚樹, 林和幸, 海野寿康: 生体触媒を活用した炭酸カルシウム結晶析出による地盤固化効果の検討, 土木学会論文集 C(地圏工学), Vol. 70, No. 2, 290-300, 2014
- (2) 尾上薫, 松本真和, 鹿田洋平, 布留川夕子: 多成分水溶液系の平衡論を考慮した炭酸カルシウムの反応晶析, J. Soc. Inorg. Mater. Japan 10, 3-11 (2003)
- (3) 京都大学, ノリタケカンパニー, 三井化学, トクヤマ, 日本触媒, 豊田自動織機: 「アンモニア燃料電池」SIP 委託研究(2017)