

アミノ酸による栄養条件が 酵母のストレス耐性に及ぼす影響

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 バイオ研究部 2年 清水美里

<<はじめに>>

【研究の背景】健康志向に乗って、各種サプリメントの消費が進んでおり、特にアミノ酸サプリメントの販売が盛んになりつつある。一方、その効果について疑問視する意見も散見している。そこで、ヒトと同じ真核細胞である微生物の酵母を用いて、アミノ酸の栄養的な効果について、検証を試みた。【研究の仮説】アミノ酸に富んだ栄養条件にある酵母は、アミノ酸の少ない条件にある酵母に比べ、ストレスに対する耐性が向上する。

【実験計画】

1. 酵母にとっての環境ストレス条件を明らかにする。
2. アミノ酸条件による酵母コロニーの成長を確認する。
3. 環境ストレス下でのアミノ酸条件が酵母コロニーの成長に及ぼす影響を確かめる。

<<材料>>

【酵母】

- 酒酵母：市販の酒粕から分離した日本酒醸造用酵母
- パン酵母：市販ドライイーストから得た製パン用酵母
- W303：園芸高校保管の遺伝子組み換え実験用ウラシル合成遺伝子欠損酵母(必須アミノ酸を持つ酵母)

【培地】

- 酵母カビ用培地
 - ・グルコース 50g/L ・ペプトン 5g/L ・イーストエキス 2g/L ・ K_2HPO_4 4g/L
 - ・ KH_2PO_4 2g/L ・ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L ・pH5.6 ・固化時は寒天15g/L
- アミノ酸調整培地

□アミノ酸全欠損(SD)：

- ・イーストナイトロジェンベース(アミノ酸を含まない) 6.7g/L
- ・グルコース 20g/L ・2%寒天

□アミノ酸全添加(SC)：

- ・アミノ酸全欠損培地 ・0.2% アミノ酸混合物

<アミノ酸混合物組成>

- ・アデニン 0.5g、アラニン 2.0g、アルギニン 2.0g、アスパラギン 2.0g、アスパラギン酸 2.0g、システイン 2.0g、グルタミン 2.0g、グルタミン酸 2.0g、グリシン 2.0g、ヒスチジン 2.0g、イノシトール 2.0g、イソロイシン 2.0g、ロイシン 10.0g、リシン 2.0g、メチオニン 2.0g、p-アミノ安息香酸 2.0g、フェニルアラニン 2.0g、プロリン 2.0g、セリン 2.0g、トレオニン 2.0g、トリプトファン 2.0g、チロシン 2.0g、ウラシル 2.0g、バリン 2.0g

□特定アミノ酸添加培地

- ・アミノ酸全欠損培地 ・0.08% 特定アミノ酸

<<方法>>

【実験1】温度及びpH条件ストレス下での酵母の増殖実験

温度ストレス：

- ①酵母カビ用培地に生理食塩水に懸濁した各酵母を塗抹し、20℃、30℃、40℃の各条件下で培養した。
- ②培養4日目に各培地に形成した単独コロニーのもっとも大きい5つの直径を計測した。

pHストレス：

- ①pH3、6、9に調整した酵母カビ用培地(液体)50mLに各酵母を1白金耳を入れ、30℃、150rpmで1日間振とう培養した。
- ②培養1日後に各液体培地を3000rpmで5分間遠心、集菌し、60℃で1~2晩乾燥させ、菌体の重量を精密天秤で計測した。

【実験2】アミノ酸栄養条件による酵母のコロニー成長実験

- ①アミノ酸全添加培地・アミノ酸全欠損培地・グリシン、トリプトファン、チロシン、リシンの各添加培地に3種類の酵母を塗抹し、30℃で4日間培養した。
- ②4日後、各培地上に形成した単独コロニーのもっとも大きい5つの直径を計測した。

【実験3】アミノ酸添加条件による酵母の温度ストレス耐性実験

- ①アミノ酸全添加培地・アミノ酸全欠損培地・リシン添加培地、酵母カビ用培地に酒酵母とW303を塗抹し、30℃と40℃で培養した。各条件で3枚のシャーレを供試した。
- ②各シャーレ上で形成した単独コロニーのもっとも大きい5つの直径を計測した。

<<結果>>

【実験1】温度及びpH条件ストレス下での酵母の増殖実験

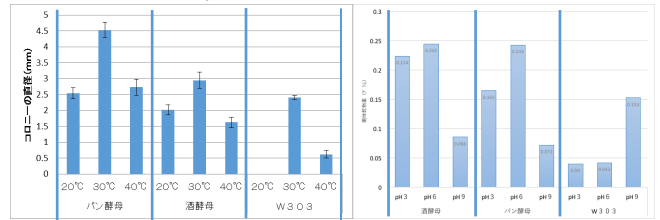


図1. 温度条件による培養3日目における形成コロニーの大きさの比較

図2. pH条件による培養2日目における酵母菌体数の重さの比較

【実験2】アミノ酸栄養条件による酵母のコロニー成長実験

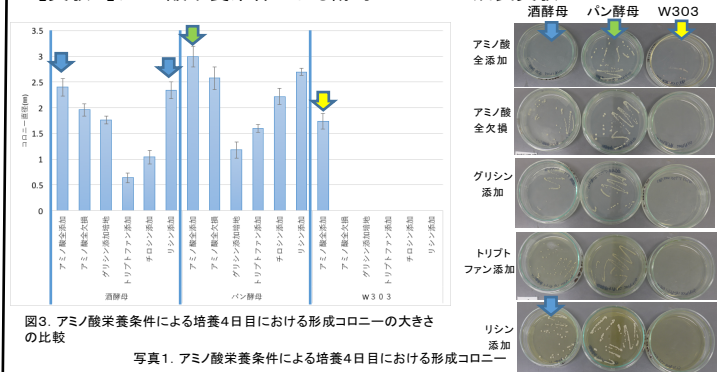


図3. アミノ酸栄養条件による培養4日目における形成コロニーの大きさの比較

写真1. アミノ酸栄養条件による培養4日目における形成コロニー

- 酒酵母：アミノ酸全添加・リシン添加条件でコロニー形成が盛んであった。(↓)
- パン酵母：アミノ酸全添加条件でコロニー形成が盛んであった。(↓)
- W303：アミノ酸全添加でのみコロニー形成が認められた。(↓)

【実験3】アミノ酸添加条件による酵母の温度ストレス耐性実験

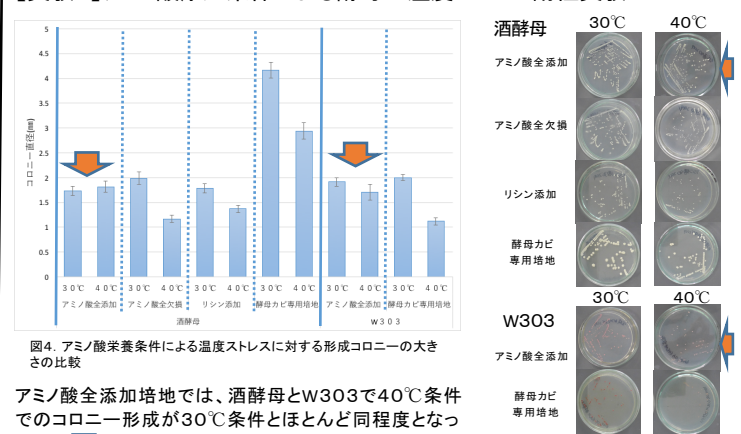


図4. アミノ酸栄養条件による温度ストレスに対する形成コロニーの大きさの比較

- アミノ酸全添加培地では、酒酵母とW303で40℃条件でのコロニー形成が30℃条件とほとんど同程度となった。(↓)

写真2. アミノ酸栄養条件による温度ストレスに対する形成コロニーの大きさ

【考察】

- 酵母の栄養条件として最適化している酵母カビ専用培地でも40℃の温度ストレスで、コロニー形成が抑制される。
- 20種類のアミノ酸が全てそろった条件では、40℃の高温ストレス化でもコロニー形成が30℃と同じ水準で実現した。
- 生理的に合成不能なアミノ酸の有無にかかわらず、アミノ酸がバランスよくある条件では、ストレス耐性が向上することが示唆された。

【結論】

アミノ酸が揃っている栄養条件では、ストレス環境下での能力の低下を抑制する働きがあると言える。ただ、ストレスのない条件では、栄養条件として、アミノ酸が揃っていることの効果は、顕著ではないと思われる。アミノ酸サプリメントはストレスの多い人に効果があるのでは。