

酵母細胞を用いた微量元素の栄養的効果の検証

大阪府立園芸高等学校バイオ研究部3年宮崎 結

【はじめに】近年、サプリメントとして鉄分や亜鉛の微量元素を補給する製品が数多く販売されている。鉄分の不足は、鉄欠乏性貧血の原因とされ、乳幼児では発達に問題が発生するとされている。また亜鉛は、味覚や免疫力の維持に必要であり肝機能を保つなど体調維持や子供の場合、成長に重要とされる。

私は、これらの微量元素の供給による細胞の変化を確かめるため、人と同じ真核細胞である酵母を用いて検証を行った。

実験区分：酵母を培養する基本培地（グルコース5%、ペプトン0.5%、イーストエキス0.2%、 K_2HPO_4 0.4%、 KH_2PO_4 0.2%、 $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.02%）に各微量元素を植物細胞培養培地への添加量を標準区として、表1に示す量を各区に添加し実験した。

表1. 微量元素添加の各実験区分の設定

微量元素	対照区	低濃度区	標準濃度区	高濃度区
鉄分 ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0 mg/L	2.8mg/L	27.8mg/L	278mg/L
亜鉛 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0 mg/L	0.86mg/L	8.6mg/L	-

【実験1：細胞分裂速度】

実験1-1：鉄分添加の影響

【方法】各設定培地に滅菌生理食塩水に懸濁した酵母を塗抹し、30℃で4日間培養した。2日目と4日目に各培地で最も大きいコロニー5個の直径を計測し、細胞分裂速度の指標とした。

【結果】低濃度区と標準濃度区では培養4日目において酵母コロニーが対照区よりも大きくなった。高濃度区では対照区と同程度であった。

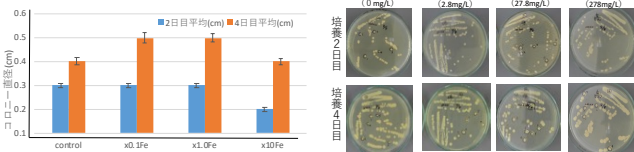


図1. 鉄分($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)を添加した培地における酵母細胞のコロニー直径の変化

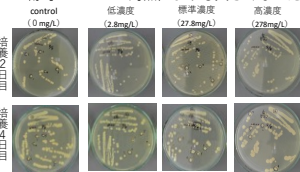


図2. 鉄分($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)の添加が酵母細胞のコロニー形成に及ぼす影響

実験1-2：亜鉛添加の影響

【方法】各設定培地に滅菌生理食塩水に懸濁した酵母を塗抹し、実験1-1と同様に行った。30℃で5日間培養した。

【結果】亜鉛の添加量に従って、酵母コロニーは小さくなった。特に標準区は培養2日目において対照区よりも小さいコロニーとなった。

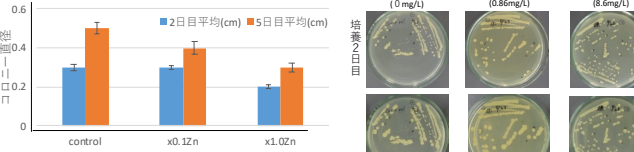


図3. 亜鉛($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)を添加した培地における酵母細胞のコロニー直径の変化

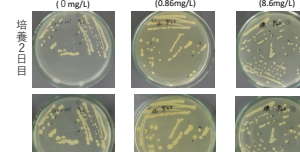


図4. 亜鉛($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)の添加が酵母細胞のコロニー形成に及ぼす影響

【実験2：アルコール発酵速度（代謝速度）への微量元素添加の影響】

実験2-1：鉄分添加の影響

【方法】①酵母細胞の培養・各実験区分の液体培地50mLに1白金耳分の酵母細胞を懸濁し、30℃、150rpmで17時間培養した。

②集菌・培養で得られた菌液を3000rpmで5分間遠心し、菌体を沈殿させ、液体培地を取り除いた。

③アルコール発酵試験・60mLの菌液から得られた菌体を35mLの10%スクロース液に懸濁し、アインホルン管を用いて発生ガス量を計測した。発酵試験は30℃で90分間行った。

④菌体数の確認・③に使用した発酵液は10分の1希釈液を調整し、ヘマトメータを用いて菌体数を計測した。

【結果】直接の発生ガス量を発酵液中の同一酵母細胞数(1.0x10⁸)あたりで比較した結果を図5に示した。酵母を育成した培地中の鉄分の添加量が低濃度区と標準濃度区では、無添加の対照区よりも発生ガス量は多くなった。

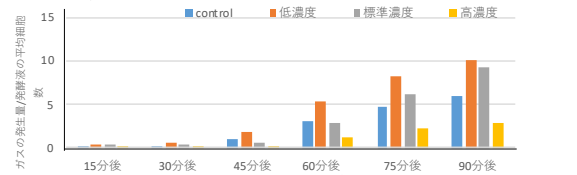


図5. 酵母育成培地中の鉄分濃度とアルコール発酵試験における単位細胞あたりのガス発生量の違い

実験2-2：亜鉛添加の影響

【方法】実験2-1と同様の方法で行った。

【結果】

直接の発生ガス量を発酵液中の同一酵母細胞数(1.0x10⁸)あたりで比較した結果を図6に示した。酵母を育成した培地中の亜鉛の添加量が

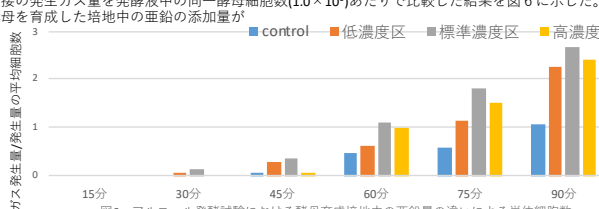


図6. アルコール発酵試験における酵母育成培地中の亜鉛量の違いによる単位細胞あたりのガス発生量の違い

【実験3：亜鉛濃度試験】

【方法】①酵母細胞の培養・各実験区分の液体培地50mLに1白金耳分の酵母細胞を懸濁し、30℃、150rpmで17時間培養した。

②集菌・培養で得られた菌液を3000rpmで5分間遠心し、菌体を沈殿させ、液体培地を取り除いて35mLの10%スクロース液に懸濁した。

③アルコール発酵試験・アインホルン管を用いて発生ガス量を計測した。発酵試験は30℃で90分間行った。なお、発酵液の一部について1/10希釈液を調整し、ヘマトメータを用いて菌体数を計測した。

【結果】結果を図7に示した。濁度試験では100倍濃度までは生育阻害は見られなかったが、1000倍濃度で明らかなOD値の低下が見られたことから高濃度による増殖障害が発生していたことが要因であると思われる。

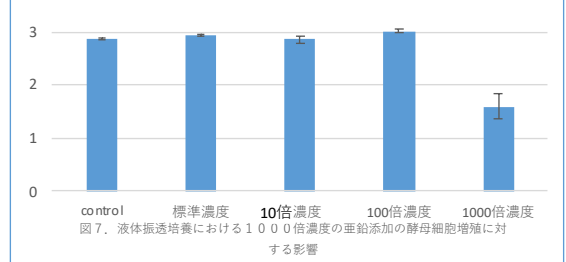


図7. 液体振盪培養における1000倍濃度の亜鉛添加の酵母細胞増殖に対する影響

【実験4：温度試験】

実験4-1：鉄分添加による温度ストレスに対する影響

【方法】対照区と標準濃度区を比較する実験を行った。培養温度は10℃、20℃、30℃、40℃の4区分を設けた。

設定した各培地に生理食塩水中に懸濁した酵母を塗抹し、30℃で17日間培養した。計測は、それぞれ2回ずつ行い、各培地上で最も大きい5個の単独コロニーを対象としてその直径を計測した。

【結果】結果を図8に示した。40℃で培養したとき、標準濃度区は対照区よりもコロニー形成が抑制された。培養3日目、6日目、10日目のコロニーの様子を図9に示した。

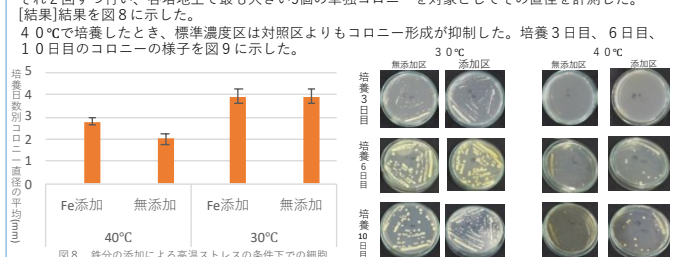


図8. 鉄分の添加による高温ストレスの条件下での細胞分裂速度への影響

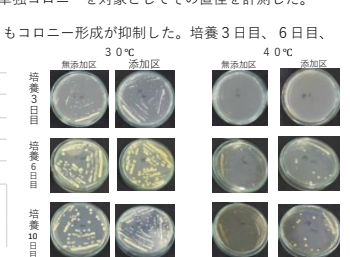


図9. 鉄分($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)の温度ストレス環境下のコロニー形成に及ぼす影響

実験4-2：亜鉛添加による温度ストレスに対する影響

【方法】実験4-1と同様に行った。

【結果】結果を図10に示した。

10℃で培養したとき、標準濃度区は対照区よりもコロニー形成が抑制されなかった。培養3日目、5日目、9日目、12日目のコロニーの様子を図11に示した。

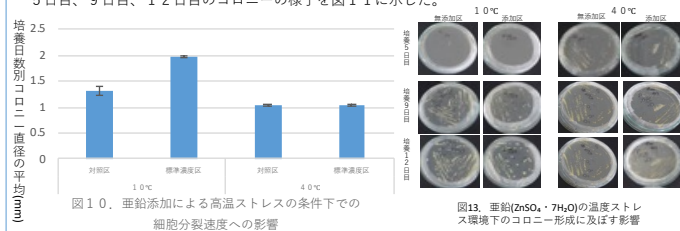


図10. 亜鉛添加による高温ストレスの条件下での細胞分裂速度への影響

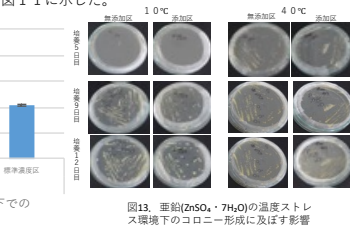


図11. 亜鉛($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)の温度ストレス環境下のコロニー形成に及ぼす影響

【考察】

細胞分裂速度について、平板培地中に含まれる亜鉛は低濃度区から容量相関で抑制した。しかし鉄分は、低濃度区と標準濃度区で細胞分裂を促進した。

アルコール発酵を指標に実験した細胞の代謝能力について、酵母細胞の育成培地中の鉄分は、同一細胞数あたりのガス発生量で比較したところ、低濃度区と標準濃度区で促進した。また、亜鉛では標準濃度区が一番ガス量が多いことから、代謝速度に関してはよい結果をもたらせた。

亜鉛の濁度試験では100倍濃度までは生育阻害は見られなかったが、1000倍濃度で明らかなOD値の低下がみられたことから高濃度区による増殖障害が発生していたことが要因であると思われる。

温度試験では鉄分について、適温では生育に差は見られなかったが、高温である40℃では標準濃度区よりも対照区に明らかな生育阻害がみられた。これは鉄分を添加することにより、高温ストレスでの生育阻害を軽減したと考える。亜鉛については10℃で培養したものと40℃で培養したものはあまり生育に差は見られなかったが、10℃では標準濃度区よりも対照区に生育阻害がみられた。これは、亜鉛を添加することにより、低温ストレスでの生育を軽減させたと考えられる。

【参考文献】

- ・大澤勝次,久保田 旺-植物バイオテクノロジー-農山漁村文化協会,平成18年2月15日,235.
- ・東証プライム上場(株)学研ホールディングス[証券コード:9470]グループのメディカル・ケア・サービス(株)
- ・鉄分が不足するとどうなるの?不足症状や不足の原因を紹介.健達ねっと. 9月12, 2022. <https://www.mcsg.co.jp/kentatsu/health-care/20275>
- ・東証プライム上場(株)学研ホールディングス[証券コード:9470]グループのメディカル・ケア・サービス(株)
- ・亜鉛が不足するとどうなるのか?原因と症状を解説.健達ねっと. 10月29, 2022. <https://www.mcsg.co.jp/kentatsu/health-care/18138>
- ・中西載慶-微生物利用-実教出版株式会社. 2014年3月1日,181.
- ・越智猛夫-バイオテクノロジーII-農業図書株式会社.1989年7月20日.132.