

# 酵母の耐塩性を利用した特殊塩の開発

松田茂樹\*

Development of mineral enriched salt by halotolerant yeast

Shigeki MATSUDA\*

味噌から分離した耐塩性酵母の各種金属に対する耐性を調べ、銅や亜鉛の存在下で増殖する酵母(16-1W株)を見出した。この酵母を100ppmの銅や亜鉛を含む食塩10%のYPD培地で培養したところ、菌体中のこれらの金属濃度は酵母の増殖とともに増加したことから、この酵母は菌体内に金属を蓄積するものと考えられた。また、酵母に取り込まれる金属の量は培養条件により影響を受け、初発pHが5以下の場合において高度の蓄積量が認められた。

銅又は亜鉛を含む培地でこの酵母を培養し、遠心分離で回収した菌体を海水に懸濁した後、蒸発乾固して塩を調製した。この塩には通常の塩に比べて約1000倍の酵母由来の銅又は亜鉛が含まれることから、ミネラルのサプリメントとしての利用のほか植物の微量要素供給としても利用可能と考えられる。

## 1.はじめに

近年、若年層を中心に偏食などにより、心身の健康が損なわれていることが指摘されている。また、人の体内に微量ミネラルが欠乏することによって、様々な障害が現れることも明らかになってきた。例えば、偏食あるいは生活習慣病の治療薬を長期間服用することによって、血液中の亜鉛が不足し、味盲になることがある。この予防としては亜鉛を多く含む海藻などを摂取することが必要である。このような微量ミネラルの欠乏による機能障害は亜鉛だけでなく銅、クロム、マンガン、ヨウ素などの不足によっても種々の症状が現れることが報告されている<sup>1)</sup>。

一方、塩は食品の製造や保存性に関して重要な成分であり、調理上の呈味性としても不可欠のものである。最近では従来の塩と異なる特殊な塩の開発が盛んになり、特に欧米では特定のミネラルを含有する、いわゆる「ミネラル酵母」の開発がなされ、不足がちなミネラルを摂取する手段として定着しつつある<sup>2,3)</sup>。しかしながら、特殊なミネラルやビタミンを含む「酵母塩」のようなミネラル塩は存在しない。そこで、このような特殊な塩を開発することにより、食品加工分野や栄養補助食品の分野での利用に資することができると考えられる。そこで、本研究では味噌から分離した耐塩性酵母を用いて食塩存在下で金属を蓄積する酵母を検索した。その結果、亜鉛、銅その他の金属を菌体に吸着するユニークな耐塩性酵母を見出した。また、この酵母の菌体内蓄積に係る培養の諸条件を検討して、菌体に高濃度に金属を蓄積する方法を検討した。また、この金属を含有する酵母を海水に添加して、濃縮することにより酵母に由来するミネラルを含有する塩を開発したので、その結果を報告する。

## 2.実験方法

### 2.1 耐塩性酵母の使用菌株と培養方法

耐塩性酵母は県内の味噌製造企業から入手した麦味噌を分離源とし、既報により分離した当センター保存の菌株を用いた<sup>4)</sup>。試験に用いた培地は、10%食塩を含む2%グルコース、2%ポリペプトン、1%酵母エキスの液体培地(YPG培地)を使用した。また、培養に際してはスラントから1白金耳を5mlの液体培地に接種し、30℃で48時間静置培養を行った。この一次培養液を種々の金属を含むYPG培地に1%の割合で添加し、所定の時間振とう培養を行った。

酵母の増殖は660nmの吸光度測定及び105℃2時間の乾燥法により菌体重量を測定した。

### 2.2 耐塩性酵母の金属耐性試験

当センター保存の耐塩性酵母90菌株を濃度100ppmの銅あるいは亜鉛を含むYPG培地で培養し、生育の良かったものを金属耐性株として選抜した。

### 2.3 酵母菌体に含まれる金属の測定

培養液から遠心分離で菌体を回収し、蒸留水で洗浄した後、再度遠心分離で菌体を回収した。これを更に2回繰り返し、得られた菌体を硫酸で分解し、酵母菌体に含まれる金属を原子吸光光度計(SOLAAR969AA:日本ジャーレル・アッシュ社製)で測定した。

### 2.4 金属の酵母への取り込みに及ぼす培養条件の影響

酵母菌体への金属の取り込みに関する初発pHの影響を調べるために、pH3.0から7.0まで調整したYPG培地で酵母を30℃で3日間振とう培養し、生育度と菌体に取り込まれた金属量を測定した。

銅濃度10ppmと100ppmを試験区とし、銅を含まない培地を対照とした。

### 2.5 酵母塩の製造方法

銅あるいは亜鉛を含む培地で30℃、2日間培養して得られた金属を含む酵母菌体を遠心分離で回収し、海水に

\* 微生物応用部

問い合わせ先: matsuda@kmt-iri.go.jp

懸濁した。これを煮詰めることにより酵母由来の金属を含有する「酵母塩」を作製した。

### 3. 実験結果及び考察

#### 3.1 金属耐性を有する耐塩性酵母の分離

味噌から分離した当センター保存の耐塩性酵母90株から亜鉛及び銅に対する耐性を有するものを調べた。亜鉛については150ppmを含む10%食塩YPG培地で30℃、2日間培養して増殖度を調べた。この結果、金属耐性が高いと思われる7種類の酵母、16-1W、B19-1、B17、14-1W、B83、31-1Wおよび*Z. rouxii*を選んだ。

次に、銅の耐性を有するものとして同じく銅100ppmを含むYPG培地で培養した結果、生育の良かったもの4株(16-1W、B1、B16、HS)と生育のよくなかったもの3株(B20、Y4-1、2-3Y)を選抜した。これらの酵母の銅濃度による生育度を比較した結果を図1に示す。以上の結果から16-1Wは亜鉛および銅に対する耐性が優れていることが明らかになったので、有用株として以下の実験に供し

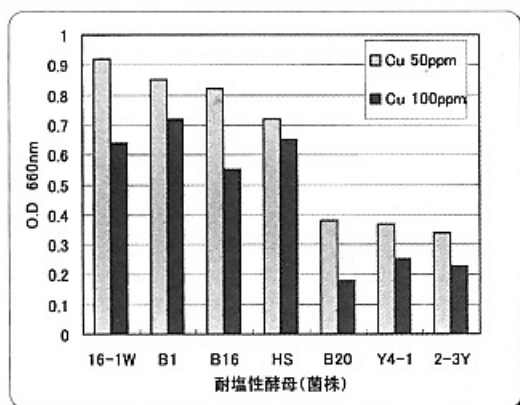


図1 耐塩性酵母の銅に対する耐性 (30℃ 48時間培養)

た。16-1Wの各種金属に対する耐性を調べた結果を図2に示す。この結果から16-1W株は金属濃度が低い程、生育は良いものの種々の重金属に対して100ppm程度の濃度でも増殖可能なことが分かった。これまで、ワイン酵母は銅などの金属に対する強い耐性があると報告されているが

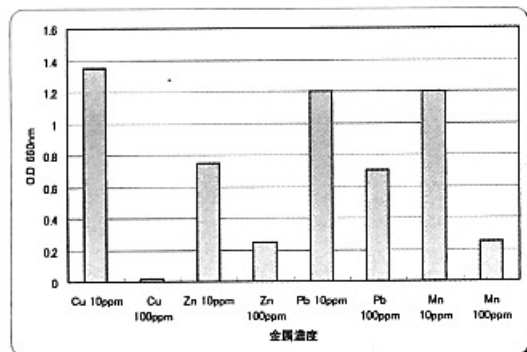


図2 耐塩性酵母(16-1W)の各種金属に対する耐性

5)、味噌・醤油中に存在する耐塩性酵母にこのような金属耐性があることを報告した例は見あたらないことから、この酵母は特異的なものであると考えられる。

#### 3.2 耐塩性酵母の金属耐性と菌体への吸着

亜鉛に対する耐性が認められた菌株について、酵母菌体への亜鉛の蓄積量と菌体量との関連を調べた結果を図3に示す。これらの菌株では亜鉛濃度100ppmで培養した培地中に生育した酵母菌体には培養液当たり0.3～

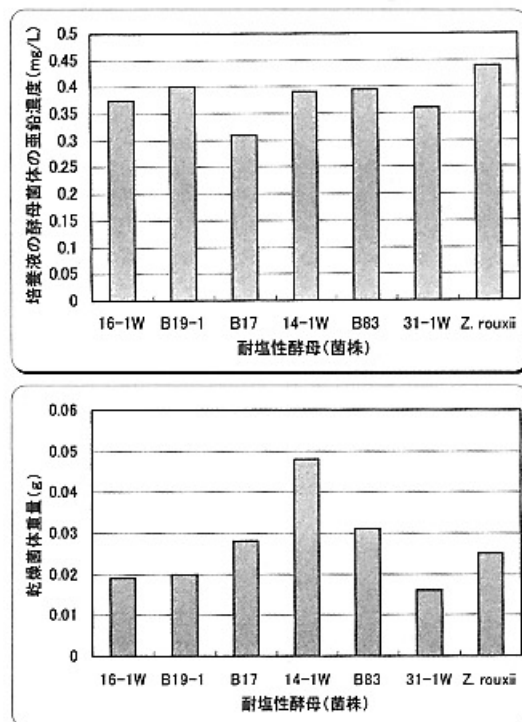


図3 耐塩性酵母の亜鉛に対する耐性と菌体への吸着

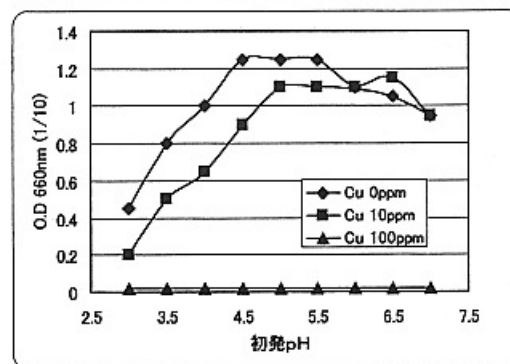
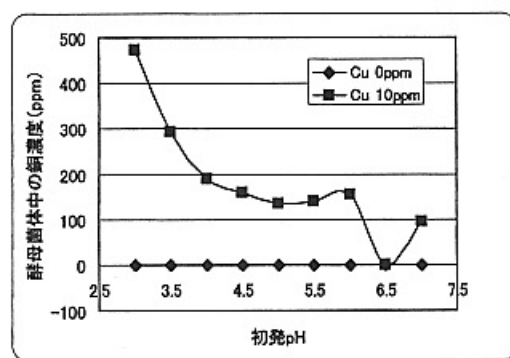


図4 耐塩性酵母の生育と金属の吸着に及ぼす培養条件(初発pHの影響)

0.44ppmの濃度で蓄積されていることが分かった。しかしながら、酵母の菌体量は菌株によって差が認められたことから、亜鉛に対する耐性と菌体への吸着量の関連は少ないものと推察された。

### 3.3 金属の酵母への取り込みに及ぼす培養条件の影響

耐塩性酵母16-1Wを用いて、銅を含む培地の初発pHが酵母の生育と銅の吸着に対する影響を調べた結果を図4に示す。酵母の生育には初発pHは4.5~5.5付近が適しており、培地中の銅濃度が高くなる程酵母の生育は悪くなる傾向が認められた。また、菌体に蓄積される銅の量は培地中の濃度が100ppmよりも10ppmの場合が多く、初発のpHが低い方が、高くなる傾向を示した。銅濃度10ppmで培養した低pH領域では乾燥菌体当たり200ppm以上の銅が存在することが分かった。なお、銅を含まない培地で生育した酵母菌体には銅が検出されないこと、および酵母の増殖が少ない場合にも銅が検出されないことから培地中の銅は酵母菌体に吸着されているものと推察される。

### 3.4 「酵母塩」の製法と特徴

耐塩性酵母16-1Wを、10ppmの銅を含む培地で培養し、遠心分離で培養後の菌体を回収した。その菌体を海水に添加し、濃縮乾固することにより酵母菌体を含む「酵母塩」を製造した。この「酵母塩」には酵母菌体由来する銅が含まれるが、培養液500mlから遠心分離により回収した酵母菌体を500mlの海水に添加して「酵母塩」を製造したところ、この「酵母塩」には約10ppmの銅が検出された。この量は通常の塩に含まれる銅の量の約2000倍である<sup>6)</sup>。このように、添加する酵母菌体の量によって任意の濃度の「酵母塩」を製造することが可能である。同様に亜鉛を含む培地で培養した酵母菌体を添加することで亜鉛を含む「酵母塩」を製造することができた<sup>7)</sup>。この「酵母塩」の外観を図5に示す。「酵母塩」の結晶は通常の塩と殆ど変わらないものの、色調はやや淡黄色を有する。

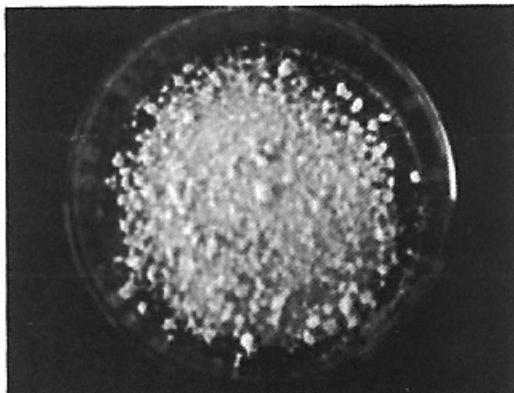


図5 「酵母塩」の外観

## 要約

本研究では、金属耐性を有する特異的な耐塩性酵母を見出し、この酵母を用いて塩分存在下で特定の金属を酵母菌体に吸着する手法を開発した。さらに、この特定の金属を含有する酵母菌体を海水とともに濃縮乾固することにより、任意の濃度にミネラルを強化した「酵母塩」を製造することができた。この「酵母塩」は栄養補助食品などのサプリメントや食品加工用素材としての利用のほか、植物栄養素としての利用も可能と考えられた。

## 謝辞

本研究の一部を担当していただきました崇城大学応用微生物工学科の森 敦、稲本満里両君に感謝します。また、ご協力いただきました大庭理一郎教授に深謝いたします。

## 文献

- 1) Masayoshi YAMAGUCHI, Megumi ENDO, Shigefumi SHIMANUKI, Masanori TEZUKA and Yoshihiro TUKADA; Anabolic Effect of Zinc-Containing Marine Alga (*Fucus*) Extract on Bone Components in Rat Femoral Tissues *in vitro* and *in vivo*, *Food Sci. Technol. Res.* Vol.5, No.1, p51-55, 1999
- 2) 特集; 特殊製法塩の市場動向を探る, 食品と開発, Vol.34, No.1, p30-36, 1996
- 3) Yumiko YOSHIE, Takeshi SUZUKI, Tira PANDOLF and Fergus M. CLYDESDALE; Solubility of Iron and Zinc in Selected Seafoods under Simulated Gastrointestinal Conditions, *Food Sci. Technol. Res.* Vol.5, No.2, p140-144, 1999
- 4) 松田茂樹, 林田安生; 麦みそから耐塩性酵母の分離とみそへの利用, 熊本県工業技術センター研究報告, No.30, p102-107, 1992
- 5) 秋山裕一, 酵母の利用と開発, 東京都, 学会出版センター, p123, 1999
- 6) 紀 杉, 藪谷智規, 伊藤彰英, 千葉光一, 原口絃貴; 天然塩製塩過程における海水から塩への元素の分配, *BUNSEKI KAGAKU*, Vol.49, No.2, p111-119, 2000
- 7) 特集; ミネラルの市場動向, 食品と開発, Vol.34, No.5, p36-41, 1996