

セレン欠乏飼料としてのトルラ酵母の再評価

吉田宗弘¹⁾・小野聡子¹⁾・館博²⁾・安藤達彦²⁾

¹⁾関西医科大学公衆衛生学教室, ²⁾東京農業大学短期大学部醸造学科

Re-evaluation of *Torula* Yeast as a Low Selenium Protein Source

Munehiro YOSHIDA¹⁾, Toshiko ONO¹⁾, Hiroshi TACHI²⁾, Tatsuhiko ANDO²⁾

¹⁾Department of Public Health, Kansai Medical University, ²⁾Department of Brewing and Fermentation,
Junior College of Tokyo University of Agriculture

Torula yeast has been used as a protein source in selenium (Se)-deficient diets. Various types of *Torula* yeast can be obtained in Japan. Their differences were evaluated. Three types of *Torula* yeast, different in species and culture conditions, were used: P, grown on a medium containing a waste of wood pulp; S-1 and S-2, grown on synthetic media. Three types of Se-deficient diet were composed of these yeast and AIN-76 mineral mixture. All diets contained less than 0.01ppm of Se. Because *Torula* P contained a high concentration of iron (249ppm), the iron content of the diet composed of *Torula* P was about four times higher than the recommended value of AIN. Male weaning Wistar rats were pair-fed on these Se-deficient diets or the diets supplemented with 0.1ppm of Se as sodium selenite for 6 weeks. Irrespective of the Se supplementation, rats given *Torula* P showed less body weight gain, and lower serum iron levels, and higher serum total iron binding capacities and hepatic aniline hydroxylase activities compared to rats given *Torula* S-1 or S-2. These findings indicate that *Torula* P, which assimilates the waste of wood pulp, contains several factors that lower the availabilities of protein and iron and induce hepatic drug metabolizing activity.

セレンの栄養学的機能を明らかにするための動物実験にはセレン欠乏飼料の存在が必須である。トルラ酵母は、セレン含量がきわめて低く、セレン欠乏飼料のタンパク質源としてもっとも広く用いられているが、セレン以外のミネラル含量が高いことが指摘されている^{1,2)}。そのため実験目的によっては、カゼインなど他の低セレンタンパク質源を選択する場合もある³⁾。

1)所在地：〒570 守口市文園町10-15

2)所在地：〒156 東京都世田谷区桜ヶ丘1-1-1

トルラ酵母はパルプ廃液処理に導入された微生物であるため、現在世界各地で入手可能な飼料用トルラ酵母の大半はパルプ廃液を資化したものである。一方、ある種のトルラ酵母は発酵生産にも用いられており、これも有用物を抽出後、飼料に用いられている。これらは同じトルラ酵母であるが、種類や生育培地が異なることから、ミネラル含量などに差異があると予想される。

本研究は、セレン欠乏飼料としてのトルラ酵母を再評価する目的で、これらのトルラ酵母の由来の差がラットの成長やミネラル状態に与える影響を検討したものである。

実験方法

パルプ廃液を資化したトルラ酵母1種（山陽国策パルプ、トルラPと略す）と発酵生産用に合成培地で生育したトルラ酵母2種（興人、それぞれトルラS-1、S-2と略す）を用い、Table 1に示した3種類のセレン欠乏基本飼料（タンパク質レベル18%）を作成した。4週齢のウイスター系雄ラット36匹を6匹ずつ6群に分け、このセレン欠乏基本飼料および各基本飼料にセレンを0.1ppm 亜セレン酸ナトリウムとして添加したセレン充足飼料を投与して pair-feeding で6週間飼育した。飼育期間終了後、すべてのラットより血清と肝臓を採取し、種々の測定に供した。なお個々の測定法については図表の脚注に記した。

Table 1. Composition of Basal Selenium-deficient Diets (%)

Ingredients	Diet P	Diet S-1	Diet S-2
<i>Torula</i> yeast P	40.4	—	—
<i>Torula</i> yeast S-1	—	39.8	—
<i>Torula</i> yeast S-2	—	—	31.5
Sucrose	46.6	47.2	55.5
Soybean oil	8.0	8.0	8.0
AIN76 mineral mixture*	3.5	3.5	3.5
AIN76 vitamin mixture	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3

*Except for sodium selenite

結果と考察

Table 2はICP発光分析によって測定した各酵母のミネラル含量をまとめたものである。酵母間で著しい差のあるミネラルは、亜鉛、マグネシウム、鉄、ナトリウム、カリウムであり、各トルラ酵母とも異なるロットで測定を繰り返してもほぼ同様の結果が得られた。特に酵母PとS-1のナトリウム含量は1%を超えていた。作成した各飼料中のミネラル含量をAIN76の推奨量⁵⁾と比較したとき、推奨量の3倍をこえたミネラルは、酵母Pで鉄とナトリウム、酵母S-1でナトリウム、酵母S-2で亜鉛と銅であった。なお蛍光法で測定したセレン含量はいずれの酵母も0.02ppm未満（飼料中濃度に換算すると0.01ppm未満）であった。

Table 2. Mineral Contents of *Torula* Yeast (ppm)

Minerals	Torula yeast		
	P	S-1	S-2
Zn	46	56	216
Cu	3	<1	17
Mg	2020	371	657
Fe	249	13	79
Mn	74	37	11
Ca	1350	1030	1030
Na	18900	14200	2240
K	700	102	3100
Se	0.013	0.012	<0.01

Minerals other than selenium were determined by an inductively coupled plasma atomic emission spectrometer. Selenium was determined fluorometrically⁴⁾.

Table 3. Body Weight and Serum Selenium and Glutathione Peroxidase

Selenium	<i>Torula</i> P	<i>Torula</i> S-1	<i>Torula</i> S-2
Body weight (g)			
Deficient	259±12	305±15	310±12
Adequate	230±14	317±4	312±15

Two-way ANOVA			
Type of <i>Torula</i>		F=18.5 (p<0.001)	
Selenium		F=0.303 (NS)	
<i>Torula</i> x Se		F=1.38 (NS)	

Serum selenium (ng/ml)			
Deficient	28±3	25±3	27±6
Adequate	183±23	198±19	269±48

Two-way ANOVA			
Type of <i>Torula</i>		F=2.01 (NS)	
Selenium		F=99.8 (p<0.001)	
<i>Torula</i> x Se		F=2.05 (NS)	

Serum glutathione peroxidase activity (μmol NADPH oxidized/min/ml)			
Deficient	0.11±0.03	0.09±0.02	0.13±0.03
Adequate	2.17±0.14	3.39±0.21	3.44±0.43

Two-way ANOVA			
Type of <i>Torula</i>		F=5.64 (p=0.009)	
Selenium		F=276 (p<0.001)	
<i>Torula</i> x Se		F=5.69 (p=0.009)	

Means ± SEM (n=6). Selenium was determined fluorometrically⁴⁾.

Glutathione peroxidase was assayed by a coupled method with *tert*-butyl hydroperoxide³⁾.

Table 4. Serum Iron and Total Iron Binding Capacity

Selenium	<i>Torula</i> P	<i>Torula</i> S-1	<i>Torula</i> S-2
Serum iron ($\mu\text{g/dl}$)			
Deficient	145 \pm 13	215 \pm 16	200 \pm 15
Adequate	79 \pm 11	168 \pm 32	223 \pm 19

Two-way ANOVA			
Type of <i>Torula</i>		F=14.5 (p<0.001)	
Selenium		F=3.57 (PS)	
<i>Torula</i> x Se		F=3.02 (PS)	

Total iron binding capacity ($\mu\text{g/dl}$)			
Deficient	473 \pm 10	431 \pm 8	455 \pm 12
Adequate	519 \pm 24	433 \pm 7	447 \pm 12

Two-way ANOVA			
Type of <i>Torula</i>		F=11.2 (p<0.001)	
Selenium		F=1.38 (NS)	
<i>Torula</i> x Se		F=2.13 (NS)	

Means \pm SEM (n=6). Serum iron and total iron binding capacity were determined by a method of ICHS^(8,9).

Table 3 は、各飼料を用いて6週間 pair-feeding で飼育したラットの体重と、血清セレン濃度およびグルタチオンペルオキシダーゼ活性をまとめたものである。セレン状態とは無関係に、トルラPを与えたラットの生育が他のラットに比較して劣っていた。パルブ廃液を資化したトルラ酵母を飼料に用いることについて大きな問題はないとされているが^(6,7)、そのタンパク質の利用効率は他のトルラ酵母に比較して悪いと判断される。

セレン欠乏群では、トルラ酵母の種類とは無関係にセレン濃度と酵素活性がいずれも著しく低下しており、どのトルラ酵母でもセレン欠乏状態が作成可能であった。一方、セレンを添加した群同士を比較すると、トルラPを与えたラットでグルタチオンペルオキシダーゼがやや低い値を示した。このことは添加した亜セレン酸の有効性がトルラPに含まれる要素によって低下したことを示している。

Table 4 は、各群ラットの血清鉄および血清総鉄結合能を測定した結果である。トルラPを与えたラットでは、他のトルラ酵母を与えたラットよりも血清鉄が明らかに低く、また総鉄結合能が増加していた。この傾向はセレン欠乏条件下ではやや小さかった。トルラPを与えたラットが、数値的にはもともと多くの鉄を摂取したにもかかわらず潜在性鉄欠乏に陥っていたという事実は、トルラPに鉄の有効性を低下させる要素が存在することを示している。

Table 5 は、肝臓の薬物代謝活性のひとつであるアニリン水酸化活性の測定結果をまとめたものである。トルラPを与えたラットでは、セレンとは無関係にこの酵素活性が上昇していた。パルブ廃液にはリグニン由来の芳香族化合物が含まれていること、さらにトルラS-1とS-2がほとんど無臭であるのに対してトルラPが独特の臭気を示すことから、トルラPには他の酵母にはない複数の有機化学成分が含まれていると予想される。トルラP投与ラットの肝アニリン水酸化活性の上昇にはこれらの有

Table 5. Hepatic Aniline Hydroxylase Activity

Selenium	<i>Torula</i> P	<i>Torula</i> S-1	<i>Torula</i> S-2
Deficient	0.258±0.041	0.138±0.010	0.153±0.012
Adequate	0.211±0.015	0.113±0.004	0.162±0.028
Two-way ANOVA			
Type of <i>Torula</i>	F=13.0 (p<0.001)		
Selenium	F=1.43 (NS)		
<i>Torula</i> x Se	F=0.847 (NS)		

Means ± SEM (n=6). Aniline hydroxylase activities are expressed as μ mol *p*-aminophenol formed per minute per mg protein. The assay was performed by a method of Imai *et al.*¹⁰⁾

機化学成分が関わっていると考えられる。

以上の結果は、トルラPにタンパク質、鉄、および亜セレン酸の有効性を低下させたり、肝の薬物代謝活性を誘導する物質（あるいは要素）の存在していることを示している。肝薬物代謝活性の誘導を除けば、その原因が生育条件（すなわちパルプ廃液）に起因するのか、それとも酵母の種類が異なることによるのかは明らかでない。しかし、セレン欠乏下における鉄代謝の研究、セレンの化学形態による有効性の変化に関する研究、セレン欠乏と薬物代謝に関する研究などを行う場合に、このような現象は大きな攪乱要素になると考えられる。トルラ酵母をセレン欠乏飼料に用いる場合には、トルラ酵母の来歴と共存成分に十分に配慮する必要があるといえる。

文 献

- 1) Burk, R. F. (1987) *Method Enzymol.* 143 : 307
- 2) Zhu, Z., M. Kimura, Y. Itowaka (1993) *Biol. Trace Elem. Res.* 37 : 219
- 3) Yoshida, M., K. Yasumoto, K. Iwami, H. Tashiro (1981) *Agric. Biol. Chem.* 45 : 1681
- 4) Watkinson, J. H. (1966) *Anal. Chem.* 38 : 92
- 5) American Institute of Nutrition (1977) *J. Nutr.* 107 : 1340
- 6) 原三郎, 矢数圭堂, 佐藤里子, 堀部真広, 田村豊幸, 菊田健一 (1964) *東京医大誌*, 22 : 65
- 7) 佐藤里子 (1964) *東京医大誌*, 22 : 288
- 8) International Committee for Standardization in Haematology (1978) *Br. J. Haematol.* 38 : 281
- 9) International Committee for Standardization in Haematology (1978) *Br. J. Haematol.* 38 : 291
- 10) Imai, Y., A. Itoh, R. Sato (1966) *J. Biochem.* 60 : 417