

Rhizopus の培養環境が *Rhizopus* 培養液中の 酵母アルコール耐性に及ぼす影響

門倉 利守*・畠井 悟・本多 宏明・中里 厚実・金子 太吉・竹田 正久

(2006年10月10日受付 2006年12月25日受理)

Influence of Culture Conditions of *Rhizopus* on Yeast Alcohol Tolerance in *Rhizopus* Culture Liquid — Note —

Toshimori Kadokura*, Satoru Hatai, Hiroaki Honda, Atsumi Nakazato, Takichi Kaneko, and Masahisa Takeda (Department of Fermentation Science, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502) *Seibutsu-kogaku* **85**: 115-119, 2007.

The culture liquids were obtained from aerated cultures of *Rhizopus javanicus* in synthetic medium. The culture liquids were used in production of sake, as well as in effective recycle of biomass. In this research, the growth state of *R. javanicus* at the time of culture liquids preparation, the influence the culture liquids gives to alcohol tolerance level of the yeast, and the amount of enzyme production in the culture liquids were investigated. The culture conditions of *Rhizopus* greatly controlled the yeast alcohol tolerance at the time of the culture liquids preparation. The culture liquids did not stimulate the yeast growth in the medium containing ethanol, when prepared under aeration at initial pH 7.0. Similarly, the culture liquids did not stimulate the yeast growth in the medium containing ethanol, when prepared under aeration without ZnSO₄ and Fe₂(SO₄)₃. When *Rhizopus* of the culture liquid formed a pulp mycelium or aerial mycelium, the stimulation was strong. It is assumed that the effect of stimulation on the growth of the yeast depends on the physiological function of *Rhizopus* being altered by the mycelial morphology, and the amount of growth of *Rhizopus*. Multiple kinds of enzymes were produced in the culture liquids, and those are expected to be utilized effectively.

[Key words: *Rhizopus*, culture conditions, mycelium, microelement, ethanol tolerance]

前報¹⁾において各種糸状菌を用いて、白米を基質とした培地あるいは合成培地で通気攪拌培養して得られた糸状菌培養液の酵母アルコール耐性に及ぼす影響を検討し、清酒酵母が増殖できないアルコール（エタノール）濃度において *Aspergillus* 属、*Rhizopus* 属などで調製した各種糸状菌培養液を添加することにより、酵母の増殖が認められた。この中でも *Rhizopus* 培養液（以下 *Rh.* 培養液）は、酵母のアルコール耐性増強作用の他に、腐造乳酸菌の増殖を抑える効果も認められた²⁾。したがってこの *Rh.* 培養液は、新規の清酒醸造への利用³⁾ や生ごみなどの有機性廃棄物からのエタノール生産への適用⁴⁾ が期

待される。そこで本報では、*Rh.* 培養液をこれら産業利用に発展させるため、*Rhizopus* の培養環境および生育状態が、酵母アルコール耐性増強作用に及ぼす影響について検討を行った。

Rh. 培養液の調製は前報¹⁾ 同様に、当研究室保存のフマル酸高生産株 *Rhizopus javanicus* 055M を用いて行った。YM液体培地（グルコース1%、Yeast ex. 0.3%、Malto ex. 0.3%、Polypepton 0.5%）にて30°Cで胞子が十分に着生するまで前培養後、Waksmanら⁵⁾ の糸状菌用合成培地（グルコース10%、(NH₄)₂SO₄ 0.5%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、CaCl₂・2H₂O 0.05%、ZnSO₄・

*連絡先 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科（〒156-8502東京都世田谷区桜丘1-1-1）
TEL. 03-5477-2380 FAX. 03-5477-2622 E-mail: kadokura@nodai.ac.jp

Table 1. Components and influence of the culture liquids of *R. javanicus* obtained by different of incubation time.

Incubation time of <i>Rhizopus</i> (h)	Acids (ml)	Formol nitrogen (ml)	Reducing suger (%)	pH	Amount of fungi (wet mg/ml)	Growth of yeast (OD at 660 nm)
0	0.6	6.9	10.0	6.0	—	0.00
24	0.7	6.4	9.6	4.2	2.4	0.00
48	1.6	5.6	9.0	2.5	6.2	0.58
72	1.8	5.3	8.8	2.3	7.1	0.65
96	1.9	5.4	8.8	2.3	7.0	0.68
120	2.2	5.4	8.7	2.1	7.2	0.65

The culture liquids were obtained from the Waksman's medium containing 10% glucose, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.005% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.005% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ in 5 l jar fermentor. The cultivation of *Rhizopus* was carried out at 30°C under aeration of 1l/min and agitation of 1000 rpm. Yeast strain used was the sake yeast (*S. cerevisiae*) ATCC 32700. Yeast was cultivated in Wickerham synthetic medium (containing 11% ethanol) at 25°C for 10 d. The concentration of the culture liquid added to the medium was adjusted to 10%.

7H₂O 0.005%, Fe₂(SO₄)₃ 0.005%) を用いて、培養環境である培養時間、初発 pH、培地組成、培養容器、培養法を変えて培養した。培養後はろ紙 (ADVANTEC No.2) を用いてろ過して *Rh.* 培養液とした。

これら培養環境を変えて調製した *Rh.* 培養液の酵母アルコール耐性増強作用に及ぼす影響については、前報¹⁾ 同様に清酒酵母 (*S. cerevisiae*) ATCC 32700 を供試菌株とした。YM 液体培地にて 30°C、48 時間、2 回植継ぎ前培養後、各種 *Rh.* 培養液を 10% 添加したエタノール 11% を含む Wickerham 合成培地 (グルコース 3%, pH 5.5) に接種し、25°C で 10 日間培養した。酵母の増殖量は分光光度計 (波長 660 nm) で吸光度を測定し、濁度により増強作用を比較した。

Rh. 培養液の成分組成は前報¹⁾ 同様に *Rhizopus* の有機酸生成量を酸度 (ml) で、グルコース消費量を還元糖量 (%) で比較し、また、合成培地で調製した *Rh.* 培養液中にはほとんどアミノ酸が生成されないため、硫酸消費量をアミノ酸度 (ホルモール滴定) の方法によりホルモール窒素量として 1/10 N 水酸化ナトリウムの滴定数 (ml) にて比較するため、国税庁所定分析法注解⁶⁾ に従って測定した。さらに、pH は pH メーターにて、ろ過後に回収した菌体はガラスろ過器 (3G2) にて吸引ろ過し、湿菌体量として測定した。また、糸状菌の代表的な生産物の一つである各種酵素と *Rh.* 培養液の酵母アルコール耐性への影響を検討するため、培養液中の糖化力、 α -アミラーゼ、および酸性カルボキシペプチダーゼを、キッコーマン製キッコーマン醸造分析シリーズで、リパーゼを和光純薬工業製トリグリセライド E-テストワコーで、酸性プロテアーゼは小沢ら⁷⁾ の方法に従って酵素活性として測定した。

はじめに、培養時間によって糸状菌の増殖量が変わることが考えられるため、5 l 容ジャーフェーマンターにて、通気量 1.0 l/min、攪拌数 1000 rpm、培養温度 30°C で *Rh.* 培養液を調製した。培養時間は 120 時間として、その間経時的に試料を採取し、酵母アルコール耐性への影響を検討した。なお、培養温度の検討については記載していないが、糸状菌の生育適温である 25°C から 35°C では酵母アルコール耐性への影響に差が認められなかったため、培養温度は 30°C とした。これらの *Rh.* 培養液の成分と酵母アルコール耐性への影響は Table 1 に示したように、培養時間が長くなるにつれて酸度は上昇し、ホルモール窒素量と還元糖量は減少し、*Rhizopus* の増殖に従って有機酸が生成され、窒素源である硫酸と炭素源であるグルコースは減少した。しかし 48 時間以降は顕著な差はなく、湿菌体量からも *Rhizopus* の増殖は対数期後期から定常期に達しているものと推察された。また、これら培養液の酵母アルコール耐性への影響は、培養時間 24 時間の *Rh.* 培養液添加では、酵母の増殖量は 0 時間同様の濁度 0.00 で増殖せず、酵母アルコール耐性の増強作用はなかった。また 48 時間以降の培養液添加では酵母が増殖したが、72 時間以降ではその増強作用に変化がなかった。これより、酵母アルコール耐性への影響は *Rhizopus* の増殖に伴って増強され、一定量の *Rhizopus* の増殖量が必要であることが考えられた。

次に、*Rhizopus* の培養環境である糸状菌合成培地の初発 pH を pH 4.0 から pH 7.0 で変化させ、前述の培養方法に従って培養時間は 72 時間とし、*Rh.* 培養液を調製して検討した。培養液の成分と影響は Table 2 に示した。酸度はいずれの初発 pH においても違いはなかったが、ホルモール窒素量は初発 pH 7.0 のみ 6.0 ml と多く、硫酸消費

Table 2. Components and influence of the culture liquids of *R. javanicus* obtained at different of initial pH of the mediums.

Initial pH in medium	Acids (ml)	Formol nitrogen (ml)	Reducing suger (%)	pH	Amount of fungi (wet mg/ml)	Growth of yeast (OD at 660 nm)
4.0	2.1	4.7	7.9	2.1	7.1	0.28
5.0	2.0	4.9	8.6	2.2	7.6	0.65
6.0	2.0	4.5	8.8	2.2	7.3	0.61
7.0	2.0	6.0	8.7	2.6	6.9	0.00

The experimental conditions were identical to those in Table 1, except that the incubation time of *Rhizopus* was 72 h.

Table 3. Components and influence of the culture liquids of *R. javanicus* obtained by difference of carbon sources in the medium.

Carbon source in medium	Acids (ml)	Formol nitrogen (ml)	Reducing suger (%)	pH	Amount of fungi (wet mg/ml)	Growth of yeast (OD at 660 nm)
Glucose	2.1	5.3	8.1	2.2	7.3	0.62
Starch	2.3	6.2	0.3	2.6	9.6	0.48

The experimental conditions were identical to those in Table 2.

量が少ないか、代謝産物が異なることが推察された。また、還元糖量は初発 pH 4.0 で最も低く、消費糖量が多かったが、培養液調製後の *Rhizopus* の湿菌体量は 6.9 ~ 7.6 mg/ml で顕著な差はなかった。これら培養液の酵母アルコール耐性への影響については、初発 pH 7.0 で調製した *Rh.* 培養液添加では、まったく酵母が増殖せず、酸性側で調製した培養液には増強作用があった。しかし、初発 pH 4.0 で調製した培養液では初発 pH 5.0, pH 6.0 の半分程度の効果であり、成分および湿菌体量はこれらでほとんど違いがないことから、酵母アルコール耐性への影響は単に *Rhizopus* の増殖量だけによるのではなく、培養環境によって *Rhizopus* の生育状態および生理が異なることによるものと推察された。

そこで生理学的な面から、糸状菌による酵素生産においても培養環境により酵素の生産性が異なることが報告^{8,9)}されていることを考慮し、糸状菌合成培地の炭素源を変化させ、有機酸生成だけでなく、代表的な酵素生産との関連性を検討した。また、酵素量については *Rh.* 培養液の新たな利用法としても有効であると考えられる。*Rh.* 培養液の調製は、糸状菌合成培地中の炭素源をグルコースあるいはデンプンを用いて前述の培養方法に従って調製した。培養液の成分と酵母への影響は Table 3, 酵素量は酵素活性として Table 4 に示した。培養液の成分は炭素源をグルコースとした場合にはこれまでと同様の

Table 4. Enzyme activity of the culture liquids of *R. javanicus* obtained by different of carbon source in medium.

Enzyme	C source	
	Glucose (U/ml)	Starch (U/ml)
Saccharifying power	No detection	24.5
α -Amylase	0.04	No detection
Acid protease	0.8	0.6
Acid carboxypeptidase	600	650
Lipase	1.2	0.9

The experimental conditions were identical to those in Table 3.

結果であったが、デンプンとした場合には還元糖が 0.3% と少なく、*Rhizopus* の増殖に必要なデンプンが糖化され消費されたものと考えられた。また、ホルモール窒素量は 6.2 ml と若干多く、前述の初発 pH を 7.0 にした場合とほぼ同様であり、湿菌体量は 9.6 mg/ml と炭素源をグルコースとした場合より多かった。酵素量については、グルコースを用いた場合には糖化力が検出されず、デンプンを用いた場合には α アミラーゼが検出されなかった。しかし、デンプンを用いた場合には糖化力が 24.5 U/ml と高く、リパーゼが若干低かった。その他の酵素につい

Table 5. Components and influence of the culture liquids of *R. javanicus* obtained by difference between culture method and medium composition.

Culture method	Presence of microelement in medium	Acids (ml)	Formol nitrogen (ml)	Reducing suger (%)	pH	Amount of fungi (wet mg/ml)	Mycelial morphology of <i>Rhizopus</i>	Growth of yeast (OD at 660 nm)
Shaking	Addition	2.9	5.6	7.7	2.4	9.3	Pulpy	0.30
Shaking	No addition	1.8	6.5	7.9	2.6	4.1	Pellet	0.01
Standing	Addition	2.1	5.9	7.8	2.4	8.5	Aerial mycelium	0.36
Standing	No addition	1.8	6.8	8.7	2.9	2.7	Aerial mycelium formed spore	0.16

The microelements were $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and $Fe_2(SO_4)_3$.

The experimental conditions were identical to those in Table 1, except that the cultivation of *Rhizopus* was carried out in Sakaguchi flask by shaking on 130 rpm for 72 h or standing for 14 d.

ては、どちらを炭素源としても大差ない酵素量が検出され、炭素源を変えて *Rh.* 培養液を調製したため、糖化関連酵素に違いがあった。これら炭素源を変えて調製した培養液の酵母アルコール耐性への影響については、グルコースで調製した培養液添加では前述までの実験とほぼ同様の増強作用であった。しかし、デンプンで調製した場合には *Rhizopus* の増殖量が多かったものの、酵母の増殖量が0.48と若干少なく、酵母のアルコール耐性増強作用が *Rhizopus* の増殖量ではなく、*Rh.* 培養液中のホルモン窒素量、および生産される酵素の相違などの *Rhizopus* の生理に影響されているものと推察された。

一方、*Rhizopus* の生育状態も *Rh.* 培養液の酵母アルコール耐性増強作用に影響を及ぼすことが考えられたため、培地中の微量金属によって有機酸の生産量と菌糸形態に影響があることが報告^{10,11)}されていることを考慮して検討した。その際の *Rh.* 培養液の調製は、糸状菌用合成培地中の $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ と $Fe_2(SO_4)_3$ を添加および無添加とし、培養法を振盪あるいは静置培養とした。また、培養容器は坂口フラスコを用い、振盪培養は振盪数 130 rpm, 72時間, 30°Cで行い、静置培養は *Rhizopus* の増殖量が振盪培養と同程度になるように14日間, 30°Cで行った。培養液の成分と影響はTable 5に示すように振盪培養においては、微量元素である $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ と $Fe_2(SO_4)_3$ を添加した場合に酸生成量、湿菌体量が多く、*Rhizopus* はパルプ状に増殖した。これに対して無添加の場合は、酸度が低く、ホルモン窒素量が多く、湿菌体量は微量元素添加の半分以下と少なく、菌糸形態も直径5 mm前後のペレット状の増殖で異なった。静置培養では、微量元素の添加、無添加で酸度にあまり違いがなく、振盪培養・微量元素無添加と同程度であったが、ホルモン窒素量は無添加で多かった。還元糖量は微量元素添加で少なく、湿菌体量が無添加の3倍以上多いことから、添加

および無添加共に気生菌糸ではあったが、微量元素を添加して調製したもので *Rhizopus* の増殖が良好であった。また、微量元素無添加の場合は早期に胞子を形成し、添加の場合は14日間の培養では胞子の形成はなく、若干形態が異なった。これら培養液の影響は、振盪培養・微量元素無添加で調製した *Rh.* 培養液では、酵母がほとんど増殖しなかったが、静置培養・無添加では酵母の増殖が0.16で若干の増強作用があった。しかし、微量元素添加に比較して湿菌体量は少なく、前述までの培養液添加と同様にホルモン窒素量の多い培養液は増強作用が弱かった。一方、微量元素添加では、振盪培養および静置培養共に酵母の増殖量は0.3前後で、酵母のアルコール耐性が増強されたが、前述のジャーファーメンターで調製した *Rh.* 培養液に比較して *Rhizopus* の湿菌体量は約1.3倍多かったものの、酵母アルコール耐性増強作用は半分程度と弱く、培養法の相違が影響しているものと考えられた。つまり、酵母アルコール耐性増強作用は坂口フラスコで培養した場合には *Rhizopus* がペレット状に増殖した培養液で効果がなく、パルプ状あるいは気生菌糸のように菌糸が分散して増殖した場合に効果があり、ホルモン窒素量が若干多いものはその効果が弱かった。この菌糸形態に関しては、これまでに報告されている糸状菌の有用物質生産において、ペレット状菌糸が有効である⁹⁻¹²⁾ というものとは異なった。このことから、酵母アルコール耐性増強作用は、単に培養液調製のための培地成分によるものではなく、培養環境による *Rhizopus* の菌糸形態と増殖量とに深く関わるものと考えられる。また、山内¹³⁾ は *Rhizopus* の胞子接種量の違いから菌糸形態の違いが生じ、有機酸生成量には影響がなかったことを報告しているが、本報では微量元素である $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ と $Fe_2(SO_4)_3$ の有無、および培養法の違いにより、若干ではあるが酸度、ホルモン窒素量などの *Rh.* 培養液の

成分が異なった。そして、酵母アルコール耐性増強作用にも違いが見られたため、炭素源を変えて調製した培養液同様に *Rhizopus* の生理学的な関与が示唆された。

以上より、*Rh.* 培養液の酵母アルコール耐性増強作用は、*Rh.* 培養液調製時の *Rhizopus* の培養環境、菌糸形態と増殖量、生理機能が影響を及ぼした。そして、培地中に鉄および亜鉛を含み、初発 pH 5~6 で 72 時間以上通気培養し、*Rhizopus* の菌糸が分散して増殖することによって増強作用が強くなった。また、酵母アルコール耐性増強物質は検索中であるが、通常、酵母のアルコール耐性は細胞膜成分である脂肪酸やエルゴステロールなどによって影響を受けると考えられており、清酒生もとではパルミチン酸によりアルコール耐性が増大するという報告がある¹⁴⁾。しかし、現在までの検索においては、*Rh.* 培養液の有機溶媒抽出画分に酵母アルコール耐性増強作用は完全には回収されず(データ未公開)、アルコール耐性増強作用は脂肪酸などの脂質成分ではないと推察している。一方、Izawa ら¹⁵⁾ は mRNA の核外輸送とエタノール耐性について、各種酒類の醸造過程での比較を行った結果、清酒もろみでは、麹菌が作り出す成分の影響によって mRNA の核外輸送が異なっていることを報告している。前報¹⁾において麹菌である *Aspergillus* にもアルコール耐性増強作用があったこと、本法の *Rhizopus* も麹菌と同様の糸状菌類であることを考えると、これら糸状菌の代謝産物が mRNA の核外輸送を変化させ、アルコール耐性を向上させていることも十分推察し得る。

ただし、ジャーファーメンターで調製した培養液では酵母アルコール耐性増強作用が強く、坂口フラスコで培養した場合には菌糸形態がパルプ状あるいは気生菌糸の場合には効果があり、ペレット状では効果がなかったことなど、アルコール耐性増強作用は培養方法によって大きく変化する。そのため、Higashiyama ら¹⁶⁾ が報告しているような菌糸の切断や、培地の粘性の変化など物理的要因が影響している可能性が示唆される。今後は酵母アルコール耐性の増強作用物質の検索および同定と共に、*Rhizopus* の菌体内成分や培養環境における物理的要因などの影響について検討が必要であることが示唆された。

要 約

清酒醸造、およびバイオマス再利用における有効活用を考慮して、糸状菌合成培地を用いて、*Rhizopus javanicus* により *Rhizopus* 培養液を調製し、*Rhizopus* の培養環境、および生育状態が *Rh.* 培養液の酵母アルコール耐性に及ぼす影響について検討した。*Rh.* 培養液を調製する際の *Rhizopus* の培養時間、pH、培地組成によって、*Rh.* 培養液中の酵母のアルコール耐性増強作用は変化した。これは、培養液調製時における *Rhizopus* の培養環境によって *Rhizopus* の菌糸形態、増殖量が変化し、*Rhizopus* の生理機能が異なることにより、酵母の増殖を促進する物質の生産に影響があるものと推察された。*Rh.* 培養液には酵母のアルコール存在下における増殖を増強する効果があり、各種酵素も生産されるため、有効活用できる可能性がある。

文 献

- 1) 門倉利守, 中里厚実, 竹田正久, 竹生新治郎, 谷村和八郎: 生物工学, **74**, 167-170 (1996).
- 2) 門倉利守, 中里厚実, 竹田正久: 醸協, **86**, 679-683 (1991).
- 3) 門倉利守, 田中浩二, 高橋勝治, 中里厚実, 竹田正久: 醸協, **87**, 394-396 (1992).
- 4) 前田秋一, 広井哲也, 広江 豊: 神奈川県産業技術総合研究所研究報告, **6**, 5-9 (2000).
- 5) 朝井勇宜(編): 菌の利用工業(微生物工学講座5), p.89-104, 共立出版(1956).
- 6) 第四回改正 国税庁所定分析法注解(注解編集委員会編), p.13-33, 日本醸造協会(1993).
- 7) 小沢善徳, 鈴木利幸, 助野彰彦, 長沼真知子, 館博: 醬研, **29**, 61-71 (2003).
- 8) Morita, H., Shiozawa, M., and Fujio, Y.: *Mycoscience*, **43**, 283-287(2002).
- 9) 佐藤洋枝, 河本 啓, 岡田王春, 福島弥一: 生物工学, **81**, 2-5 (2003).
- 10) Zhou, Y., Du, J., and Tsao, G.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **84/86**, 779-789 (2000).
- 11) Haq, I. U., Ali S., Qadeer, M. A., and Iqbal, J.: *Process Biochem.*, **37**, 1085-1090 (2002).
- 12) Du, L.-X., Jia, S.-J., and Lu, F.-P.: *Process Biochem.*, **38**, 1643-1646 (2003).
- 13) 山内文男: 醸協, **87**, 101-106 (1992).
- 14) Mizoguchi, H. and Hara, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 12-16 (1997).
- 15) Izawa, S., Takemura, R., Ikeda, K., Fukuda, K., Wakai, Y., and Inoue, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 86-91 (2005).
- 16) Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y., and Okabe, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 489-494 (1999).