[農化 第 36 卷, 第 1 号, p.73~77, 1962]

抗生物質の工業生産における菌株取扱に関する研究(第 1 報)*

ペニシリン生産菌株の維持増殖に関する問題点について

石 川 哲 夫 (明治製菓株式会社川崎工場製薬部)

1. 緒 言

抗生物質の工業生産において菌株改良の果たす役割の大なることはいうまでもないが、これと同時に菌株の安定維持もまた重要な問題である。筆者は工業生産における菌株取扱に関しまず抗生物質生産の嚆矢をなしたペニシリン生産菌についての研究知見を報告する。一般に抗生物質生産用種菌の維持増殖方式は次のように行われる。

ペニシリン生産菌の場合、筆者の経験によれば保存方法は砂または土壌を用いる所謂 soil culture method で 4 年以上安定に変化なく保存することができ、また孢子着生培養として本邦にては米麴式の固体培養が広く用いられ、その培養終了のものは水分 10% 以下に乾燥することにより保存性を高めることができ問題点は少い。次に再分離選別による保存培養(stock culture)の維持更新については、数多くのペニシリン生産菌 (*Penicillium chrysogenum*) の自然変異株に関する報告にもある如くその除去は極めて注意を必要とする基本事項である。ところが筆者の経験では上の点に注意を払いながらも長期に亘り同一菌株を再分離更新しつつ使用していると、ともすれば漸次菌株の変化生産能の低下を認める事例が見られるので、本点について特に植継による菌株の変化に関しての研究を行った。

2. 実 験 方 法

1) 使用菌株 *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 49-133 または Wisconsin 51-20 株より改良選別した菌株を用いている。

2) 孢子着生培養 米培地は精白米に corn steep liquor 0.5% を加えたものを用い、寒天培地としては下記 3 種類の中のいずれかを使用した。培養は米培養、寒天培養共 24° にて 7 日間培養を行い、その後の保存は冷蔵庫 (5°) 中で行った (ただし米培養は真空乾燥した後冷存した)。なお植菌は米培養よりの場合は孢子着生した米 1 粒をもってし、寒天培養よりの場合は 1 白金耳量の孢子を劃線するかまたは孢子懸濁液をつくりその一定量を植菌する方法を用いた。

寒天培地組成: Sucrose Czapek C.S.L. 寒天培地; sucrose 3%, NaNO₃ 0.3%, KCl 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, KH₂PO₄ 0.1%, corn steep liquor 1%, agar 2.5%, pH 6.4 調整。

Moyer's 寒天培地; glycerin 0.75%, glucose 0.5%, corn steep liquor 0.25%, MgSO₄·7H₂O 0.005%, KH₂PO₄ 0.006%, peptone 0.5%, NaCl 0.4%, CuSO₄·5H₂O 0.0004%, agar 2.5%, pH 6.4 調整。

Dextrose peptone 寒天培地; glucose 1.0%, peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, agar 2.5%, pH 6.4 調整。

3) 振盪培養試験 使用培地は lactose 4%, corn steep liquor 6%, KH₂PO₄ 0.3%, CaCO₃ 1.0%, 大豆油 0.6% (pH 4.4 殺菌前) の組成のものを 250 cc 容三角フラスコに 40 cc 分注, 120°, 15 分殺菌したのを用いた。ただし precursor として培養 2 日及び 3 日にフェニル酢酸 0.2% を添加する。振盪培養は 24°, 220 回転のロータリー式、振盪培養機により行った。5~8 日間培養時にペニシリン生産値を黄色葡萄球菌 209P によるカップ法を用いて測定、糖消費の測定は 4 日培養について Somogyi 法により行った。植菌は前記移植方法に準ずる。

* Investigations on Strain Maintenance and Inoculum Development of Industrially Important Antibiotic Producing Microorganisms. Part I. Some Problems about the Penicillin Producing Culture. By Tetsuo ISHIKAWA (Meiji Seika Kaisha Ltd. Pharmaceutical Division of Kawasaki Plant)

3. 実 験 結 果

1) 米培地による植継について ペニシリン生産菌株の孢子着生培地として寒天培養及び固体培養いずれも用いられているが、孢子着生の効率良く操作上便利である点より工業的に本邦では米培地が賞用せられていることは前述の通りである。従って実際の工業生産にては stock culture の量に限定があるため長年月に亘っては同一菌株について再分離、変異株の除去、stock culture の更新が行われる。その工程は次のように要約せられるので筆者はまず第一に米培地による植継の菌株に与える変化の有無について実験を試みた(第1表)。

第1表(その1)の結果を解析してみると植継代数間の平均値の変化は1%危険率で有意であり、その水準間の差を検定してみると0代に対し4代以降は明らかに生産能の低下を認める。そこで(その2)において5代までの糖消費速度、菌体量を比較してみたところ4代~5代はペニシリン生産能低くそれに伴い4日培養における

第1表 米培地による植継の菌株に与える変化

(その1)					(その2)			
継代数	実験1 u/cc	実験2	実験3	平均	継代数	4日目の糖 消費量(%)	4日目の菌体 量(mg/cc)	ペニシリン生 産値(u/cc)
0代	2153	1915	2004	2024	1代	2.71	35.5	1958
2代	1970	1913	1909	1931	2代	2.91	35.0	1908
4代	1720	1902	1900	1841	3代	3.07	41.0	2128
6代	1788	1623	1743	1718	4代	3.07	42.0	1780
8代	1732	1755	1766	1751	5代	3.28	44.5	1640
10代	1648	1683	1632	1654				

注: 使用菌株は Wis. 49-133 系生産菌株(UM株)。本実験は各代の米種母を乾燥冷存し同時培養して比較した。なお米培養は 24°, 7日培養にて次代へ植継した。

第2表 49-133 原株と同生産改良株(UM株)との比較

	ペニシリン 生 産 能 (u/cc)	振盪培養における糖の消長(残糖%)								Czapek C. S. L. agar上のcolony の大きさ (mm)
		0 日	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日		
Wis. 49-133 原株	1200 1260 1510 1480	平均1363	3.41	3.51	3.44	2.84	1.36	0.53	0.30	19.6(21.0~18.0)
Wis. 49-133 系 生産菌株 (UM株)	2110 2100 2220 2000	平均2108	3.41	3.32	3.61	3.00	2.66	1.26	0.28	17.2(19.0~15.5)

注: ペニシリン生産能及び糖消費の測定は振盪培養による培養液について測定。ただし本実験における乳粉は 3% の培地にて実施した。Czapek C. S. L. agar 上の colony の大きさは mono spore isolation 15 菌株についての 7日 24° 培養のものについて測定した。

糖消費量の増加菌体量の増加の傾向が見られる。この傾向は菌株取扱上重要な手掛りを示すものと判断せられる。その理由として本改良生産菌株と原 49-133 株との性状を比較した場合第2表に掲げたように改良株がペニシリン生産性の向上と共に糖代謝がおそくなり形態的には colony の大きさが小さくなっている事実があげられる。そこで筆者は生産能の測定のみでは変動が大きく精度がわるい点も考慮し、以下糖消費速度、発育速度等を中心として菌株の性状の変化についてさらに追究することとした。

2) Czapek C. S. L. 寒天培地による植継について 米培地は基質全体が澱粉を主成分とするものであること、またその組成の変更が難しいことから次に Sucrose Czapek

第3表 Czapek 寒天培地に対する C. S. L. の添加量と植継に対する影響

		Shake flask 4日目の残糖(%)	
		1代	5代
Czapek 寒天培地基本組成		1.83	1.02
基本組成 + C. S. L. 0.5%		1.42	1.19
" + " 1.0%		1.67	2.02
" + " 5.0%		1.65	1.77
" + " 10.0%		2.20	3.60

注: 使用菌株は Wis. 49-133 系生産菌株(UM株)

corn steep liquor 寒天培地について C. S. L. の添加濃度を変更せしめて植継による変化を糖消費の点で比較してみた(第3表)。

本結果より培地の炭素源-窒素源の比、或いは培地組成の差異が植継による菌株の変化に関係するものと判断せられる。然しながら corn steep liquor の添加量により孢子着生状態に差を認め(C. S. L. 0.5%, 1.0% > 基本組成 > C. S. L. 5%, 10%)孢子着生の良いことも必要条件であるので1.0%添加培地を取

り上げて次の実験を行った。

3) 各種孢子着生寒天培地の累代培養による比較 2) に述べた Czapek-C.S.L. 寒天培地 (1.0% 添加) の他に筆者等が通常本菌株の孢子着生培地として用いている Moyer 寒天培地, dextrose-peptone 寒天培地の 3 種について, 植継による菌株の変化に関し比較を行った。この際の植継方法は下図の如くその 1 周期を 1 代として 10 代まで植継を行った。各代の sand stock は 5° に保存しておき最後に同時に各代の sand stock を suspen-

注: 使用菌株 Wis. 49-133 系生産用菌株 (UM 株)

sion としこれを米培地に接種し 24°, 7 日間培養後乾燥しこれらの米種母について孢子着生量, ペニシリン生産能, 糖消費速度及び 10 代目のものについて平板培養分離により分離株の分布状態 (population pattern) の検査を行った (第 4, 5, 6, 7 表)。第 5 表~第 6 表について順位相関検定法⁽¹⁾により解析してみると, その ρ 値は次の如くで dextrose peptone 寒天培地のみ孢子着生量, 糖消費速度が有意となり Czapek-C.S.L., Moyer 両寒天培地では有意の値を示さず, 植継によって変化しないものと判定される。

	spore-No.	ペニシリン生産能	糖消費速度
Czapek-C.S.L. 寒天培地	$\rho = +0.01$	$\rho = +0.35$	$\rho = -0.38$
Moyer "	-0.39	-0.02	+0.63
Dextrose peptone "	+0.77**	+0.08	+0.92**

(** 1% 危険率で有意)

このことは植継 10 代後の分離株についての知見でも認められ (第 7 表), colony の大きさ, 糖消費速度において明らかに dextrose peptone 寒天培地によるもののみ差異を生じている。ペニシリン生産能は統計的有意差を認めるに至っていないが, やはり低生産能の方へずれていることがうかがわれる。

以上の結果より筆者

は, 米培地による植継に見られた菌株の変化は, 寒天培地を用いその組成を選ぶことにより改善されることを知った。また dextrose peptone 寒天培地 10 代目の知見及び前掲第 2 表菌株の比較例の知見より colony の大きさもペニシリン生産菌取扱上注目する必要があることを知った。

4) 植継による菌株の変化に対する単孢子分離純系化の効果について 前項に述べたように植継に対し安定な孢子着生培地として Czapek-C.S.L. 寒天培地を選定したのであるが, 本培地を使用してもなお Wis. 51-20 系の工場生産菌株の

第 4 表 孢子着生量 (spore-No./g)

培地	継代数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Czapek-C.S.L.		1.37	1.44	1.75	2.30	1.70	1.61	1.08	1.99	1.82	1.13
Moyer		1.30	1.61	1.87	1.75	1.13	0.94	1.22	1.37	1.63	0.89
Dextrose peptone		1.15	1.61	1.34	1.39	1.75	1.44	1.44	2.66	2.26	2.09

注: Thoma haematometer による測定値。上記の数値は 1/10⁸ したものである。

第 5 表 ペニシリン生産能 (u/cc)

培地	継代数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Czapek-C.S.L.		2170	2243	2383	2613	2663	2500	2600	2443	2397	2390
Moyer		2337	2137	2317	2520	2487	2527	2443	2573	2187	2037
Dextrose peptone		2243	2200	2397	2553	2310	2287	2633	2637	2247	1860

第 6 表 糖消費速度 (4 日培養による糖消費量 %)

培地	継代数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Czapek-C.S.L.		2.65	2.65	2.59	3.10	2.89	3.04	2.56	2.50	2.89	2.47
Moyer		2.68	2.80	2.47	2.50	2.74	2.53	2.74	3.04	2.86	2.83
Dextrose peptone		2.59	2.38	2.59	2.74	2.59	2.62	3.04	3.07	3.31	3.55

第 7 表 植継代後の分離株について

	寒天培地	分離株数	平均	範囲
Colony の大きさ (mm)	Czapek-C.S.L.	15	14.2	17.0~13.0
	Moyer	15	14.8	17.0~13.0
	Dextrose peptone	15	17.5	19.0~15.0
ペニシリン生産能 (u/cc)	Czapek-C.S.L.	15	2353	2980~1449
	Moyer	15	2399	2860~1940
	Dextrose peptone	15	2204	2750~1253
糖消費量 (%)	Czapek-C.S.L.	15	2.08	2.37~1.52
	Moyer	15	1.83	3.20~1.47
	Dextrose peptone	14	3.61	4.65~3.05

注: 植継 10 代目の sand stock より Moyer 寒天培地に平板培養し, 24°, 4 日培養, 発生した colony を同培地に移植し, 24°, 7 日培養した colony の径を測定。さらに同培養より米培地に移植し, 24°, 7 日培養後前記常法によりペニシリン生産能及び糖消費量を測定した。

第 8 表 54 Y-22 株の Czapek-C.S.L. 寒天培地による植継

分離株数 平均 範囲	原株よりの平板培養分離		5 代植継後の平板培養分離	
	Colony の大 きさ (mm)	糖 消 費 量 (%)	Colony の大 きさ (mm)	糖 消 費 量 (%)
	10 均 6.2	10 3.34 1.10	10 19.1 3.0	10 3.78 0.90

注：使用菌株 Wis. 51-20 系工場生産菌株 (54 Y-22) Czapek-C.S.L. 寒天培地 24°, 7 日培養にて植継。試験方法は第 7 表に準ずる。

第 9 表 54 Y-22 分離株の colony の大きさとペニシリン生産能との関係

	実験 1		実験 2		実験 3	
	Colony の大 きさ (mm)	ペニシリン生産能 (u/cc)	Colony の大 きさ (mm)	ペニシリン生産能 (u/cc)	Colony の大 きさ (mm)	ペニシリン生産能 (u/cc)
Colony 大 分離株	20.0	2500	18.0	3013	19.0	3200
Colony 小 分離株	9.0	3920	12.5	3285	12.0	3460

注：本実験におけるペニシリン生産能は 51 容ジャーフェメンターによる培養試験成績である。使用培地は振盪培養に同じ。

第 10 表 54 Y-22 株純粋分離後の植継

原株よりの 純粋分離株		左分離株 5 代植継後の colony の分布			
菌 株 番 号	Colony の大 きさ (mm)	分 離 株 数	Colony の大 きさ (mm)	Colony の 大きさの 範囲 (mm)	
No. 1	18.5	No. 1—5 代	8	18.4	2.2
No. 2	17.5	No. 2—5 代	10	19.4	6.0
No. 3	16.0	No. 3—5 代	10	19.5	3.0
No. 4	10.5	No. 4—5 代	10	15.3	2.9
No. 5	10.5	No. 5—5 代	10	15.8	2.7
No. 6	10.0	No. 6—5 代	11	14.8	3.2
No. 7	10.0	No. 7—5 代	10	15.0	3.8
No. 8	9.0	No. 8—5 代	10	14.1	2.3
No. 9	11.0	No. 9—5 代	10	15.1	4.3
No. 10	8.5	No. 10—5 代	10	14.8	2.9
平 均	12.2 (範囲 10.0)	原株*	10	16.7	6.2

* 5 代植継株について平板培養、分離株をとり、colony の大きさの分布の検査を行った際に同時に原株より同様の分離を行った値である。この時の値は No. 1~No. 10 を分離した時より 4.5mm 大きい値となっている。すなわち本実験の colony の大きさについてはこの点を考慮して判断する必要がある。

株の colony の大きさの順位と 5 代植継後の colony の大きさの平均値の順位間には高度有意の相関を示している ($\rho=0.885$)。このことから親株の population に変動が大である場合、単胞子分離培養により純粋にすることが菌株安定化上の第一要件であることが強調せられる。

4. 考 察

ペニシリン生産菌の継代による退化に関しては恩師有馬⁽²⁾による *Pen. chrysogenum* Wis. Q 176, *Pigmentless saltant*, *Pen. chrysogenum* Q 176 Arima et Ogasawara についての研究があり、5~7 代にて変化の兆を示し 9~11 代で形態は全く変化しペニシリン生産性も約 1/3 以下に低下すると報告され、この場合 gene の変化による安定した退化型菌株を 10~15% 生ずるとせられている。また Haas⁽³⁾ 等は Wis. 50-935 の退化について研究し、ペニシリン生産性の低下は安定なペニシリン生産性の悪い白色株の出現によるとし、この菌株は normal type と balanced heterocaryon を作りその際には生産性には影響はないが、これが何等かの条件で白色株を分離すると normal type の発育は急速に抑制され、ペニシリン生産の低下を来すとしている。しかし一方 Reese⁽⁴⁾ は菌の退化には培地、培養条件が重要で *Pen. chrysogenum* Q 176 を用いて上記の点に注意して 1 週間毎に植継いでいけばペニシリン生産性の低下なしに保持しようとしている。

筆者の使用した菌株は工業生産用として選別改良を重ね菌の純粋性は高度に保持されているものであるが、上

1 種 54 Y-22 株の場合植継による菌株の変化がみられた (第 8 表)。その結果は前述の dextrose peptone 寒天培地による植継の場合と傾向を同じくし colony の大きさは大となり、それに伴って糖消費速度も早くなっていることがわかる。ところが本原株を単胞子分離純系化を行って見たところ第 10 表にあるように形態は同一であるが、colony の大きさの変動の大であることを知った (第 1 図)。ついで本株より分離せられた colony の大きいものと小さいものについて 5 L ジャーを用いた通気

攪拌方式でペニシリン生産能を比較してみたところ colony 小のグループの方が生産能が良い結果を示している (第 9 表)。そこで本株を 1 度純粋分離した後各分離株について第 8 表と同様の方法で植継試験を行って見た (第 10 表)。その結果純粋分離後の植継株は明らかに変動が少くなっており、また 1 代目の親

第 1 図 54 Y-22 株分離株の colony
右: colony 大の分離株, 左: colony 小の分離株

述の如く継代数を多くした場合菌株の性状に変化を起すことがわかった。しかしながらその変化は明らかな形態的変異株として分別しうるものではなく、発育程度の差などで区別しうるようなもので所謂退化とは異ったものである。しかしこのような変化も工業生産の安定化上は注意を要するものである。このことは Backus^(5,6) 等がペニシリン生産菌株の population pattern を colony の大きさより分類して U, D, C, B, A-type とし (colony の大きさ $U > D > C > B > A$)、Q-176 は U-type を主として、49-133 は D-type, 51-20 は C-type をそれぞれ主としていることよりもその重要性が推測せられる (ペニシリン生産性 $51-20 > 49-133 > Q-176$)。

この点に関しては本邦生産工場にて広く用いられている米培地は必ずしも満足し得るものでなく、その継代はできる限り少くすべきである。この点より寒天培地の使用が考えられ、筆者は corn steep liquor 1% 添加の Czapek 寒天培地が継代による変化少く孢子着生培地として良いことを知った。もしこのような注意を払わないで菌株が取扱われていった場合 colony の大きい方に population pattern のずれを生じ糖代謝の早くなる現象が起る。このことは Johnson⁽⁷⁾ 他多くの研究報告にあるようにペニシリン生成と糖利用速度と極めて密接な関係のあることを考えるならば本注意の重要であることが推論せられる。

しかしながら植継に安定な培地を使用してもなお上記のような population pattern の変化を生ずることがあり、このような場合筆者の実験例では菌株の純粋性が不十分の場合に見られ、単孢子分離純系化を行うことにより安定しうることを知った。すなわち菌株の純粋分離は菌の変化防止の第一基本であり、工業的な生産菌株の維持増殖に際しては定期的に菌株の population pattern の検査を行いその純系維持に努めることが重要である。

5. 結 論

(1) 工業生産においては長期間に亘って大量に同一菌株が使われる関係上何等かの形で植継が行われていく必要が生じ、その間の菌株の変化には注意する必要がある。孢子着生培地としての米培地及び寒天培地のある種ものは継代と共に正常タイプではあるが、発育の早い型が増殖しペニシリン生産に好ましくない影響を与えることがある。

(2) 上記の継代による菌株の変化は培地組成により異り、筆者は植継に対し安定な培地として corn steep liquor 1% 添加の Czapek 寒天培地がよいとの結論を得た。

(3) 明らかな形態的変異株の発生は認めなくても colony の大きさによる population pattern に対する注意が工業的にペニシリン生産菌を取扱う場合重要で、その変動の大きい場合には単孢子分離法による純系化が必要である。本操作による再分離選別を行うことにより菌株の変化防止、生産の安定化を確実なものとするができる。

本研究を行うに当り終始御鞭撻、御指導を賜った有馬啓先生、明治製菓株式会社幹部の方々並びに本研究の発表を御許可された同社清水正雄専務、佐藤興次川崎工場長、中川超製薬部長に厚く感謝の意を表します。なお本研究の実施に当り同社鈴木衛氏に終始御協力を戴いたことを感謝します。

(1) 成実清松他：統計数理講座，2，朝倉書店。
p. 182,	(5) J. F. Stauffer et al.: <i>Anal. N. Y. Acad. Soc.</i> , 60 , Art 1, 35 (1954).
(2) 有馬 啓：J. Antibiotics, III , 445 (1949).	(6) M. P. Backus et al.: <i>Mycologia</i> , 47 , 429 (1955).
(3) F. L. Haas et al.: <i>Applied Microbiol.</i> , 4 , 181 (1956).	(7) V. F. Davey, M. J. Johnson: <i>Applied Microbiol.</i> , 1 , 208 (1953).
(4) E. Reese et al.: <i>J. Bact.</i> , 57 , 15 (1949).	