- 704 (1960).
- (6) R. Lundén : *Svensk Kem. T.*, **66**, 201 (1954).
- (7) R. Chauvin : *Bee World*, **38**, 50 (1957).
- (8) 市川親文 : 本誌, **12**, 1117 (1936).
- (9) A. E. Vivino, C. S. Palmer : *Arch. Biochem.*, **4**, 129 (1944).
- (10) 関根秀三郎, 李 貞求 : 学術協報, **16**, 563 (1942).
- (11) A. Kubo : *Japan J. Botany*, **15**, 15 (1955).
- (12) 酒田和彦, 森谷清樹, 樋浦光男 : *J. Coll. Dairy Agriculture*, **1**, 95 (1961).
- (13) 三宅 捷 : *J. Biochem. (Japan)*, **3**, 169 (1924).
- (14) F. Weygant, H. Hofmann : *Chem. Ber.*, **83**, 405 (1950).
- (15) 上野実朗 : 科学, **24**, 90 (1954).
- (16) M. Nilsson : *Acta Chem. Scand.*, **10**, 413 (1956).
- (17) 水野 卓 : 日化, **79**, 193 (1958).
- (18) 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 岩動悠子, 高橋睦子 : 本誌, **35**, 623 (1961); 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 岩動悠子, 高橋睦子 : 昭和 36 年 4 月, 日本農芸化学会大会で講演.

[農化 第 36 卷, 第 10 号, p.809~813, 1962]

L-リジン発酵における異常現象 (第 1 報)*

異常発酵の実態および異常発酵の起因追究のための条件

重 藤 稔 (協和醸酵工業株式会社富士工場)

昭和 37 年 3 月 19 日 受 理

近代発酵工業では, 目的とする物質を生産する菌株を自然界から検索選択分離するという従来の単純粗朴な方法から一歩前進して, 在来の菌を人為的に変異させて目的とする物質を生産させる能力を持った菌株に変える方法に移ってきた。こうした傾向のため, 発酵工業では今後自然界に存在する野生株よりも, 栄養要求株を使用する機会が多くなってくるものと考えられる。しかし一面これらの変異株は変異を起す頻度が高く, 特に原株への復帰が起り易いと考えられ, この種の変異が栄養要求株を使用した場合の発酵の困難性とか, 菌株管理上の問題とか, あるいは菌株使用法での問題などが起ってくると考えられる。この種の人工変異株を使用することによって可能になった L-リジン発酵中に発酵異常現象が起ったが, この原因を追究中に上述の復帰変異の問題が生じたので, その解析を試みた結果についてここに報告する。

そもそも発酵法による L-リジンの生産に関しては種々の報告^(1~5)があるが, 著者は木下⁽⁶⁾らにより得られた栄養要求株である *Micrococcus glutamicus* 901 を使用して, L-リジン発酵の工業化に成功した。しかし, この発酵中に菌の生育が一時停止したように見受けられた後旺盛な増殖をし, L-リジンはほとんど生産されない異常発酵を経験した。L-リジン発酵での異常現象の原因と考えられる点は, 1) 種菌の汚染, 2) 発酵工程管理の欠陥, 3) 原料不良, 4) 菌の変調の 4 項目に大別できるが, 以上のような諸原因のうち, どれが真の原因であるか, またその工業的対策をどのようにすべきかという問題に関して検討した結果を順次述べていくこととする。

実 験 の 部

使用菌株は *M. glutamicus* 901 で, 培養方法は第 1 次種母培地としてブドウ糖 2%, ペプトン 1%, 肉エキス 0.5%, NaCl 0.25% のものと第 2 次種母培地としては甘蔗廃糖蜜 (全糖濃度として) 5% (甘蔗廃糖蜜は以後糖蜜と略す), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%, コーンステープリカー (以後 CSL と略す) 5%, CaCO_3 1% の組成のものをを用いた。また, 主発酵培地は糖蜜を主炭素源として, 全糖濃度 20% になるように使用し, 脱脂大豆粕 (SBM と略す) を 6N H_2SO_4 で加熱分解し, アンモニヤ水で中和したものを SBM 乾物換算 1.8% 混合した組成のものをを用いた。

分析方法は, L-リジンの測定は *Bacterium cadaveris* の L-リジン脱炭酸酵素を用いる検圧法, pH は pH メーター, 菌体量の測定は比濁法, 糖の測定は Bertrand 法, 乳酸は *p*-hydroxy diphenyl を使用した。比色定量

* Abnormal Phenomena in the L-Lysine Fermentation. Part I. The States of Abnormal Fermentation and Pre-condition in order to investigate Abnormal Phenomenon.

By Minoru SHIGETO (Fuji Plant, Kyowa Fermentation Ind. & Co., Ltd.)

法, α -ケトグルタル酸 (α -KG と略す) は 2,4-dinitrophenyl hydrazine を使用した比色定量法によった。

実 験 結 果

I. 異常発酵の実態 第 1 図に正常及び異常両発酵の発酵経過を示す。すなわち正常発酵では菌体量は発酵が進むにつれて徐々に増加し、50 時間目までに乾燥菌体重量は約 25 mg/ml となるが、さらに発酵を 70 時間目まで続行してもわずかに増加する程度である。また L-リジンは 10 時間目頃から生産され始め、その量は 50 時間目頃まで直線的にあがり最高約 44 mg/ml となる。

酵と異常発酵との差は、菌の増殖と L-リジンの生産蓄積の様相に明瞭な差異が認められることである。

発酵液の外観を観察すると、正常発酵では 10 時間目頃から泡が帯白色となり、消泡剤の添加により消泡するが、異常発酵では泡に艶があり、消泡剤の添加を行っても消泡もしないしまた発泡もしない。しかし菌が極度に増殖するところになると泡の艶がなくなり発泡も旺盛となる。

菌細胞の形態は類楕円形であるが、正常、異常両発酵間で大差はなく、どちらの場合も孤立、2 連、3 連または 4 連になっているものが混在している。

II. 異常発酵の遺伝追究のための条件

(1) 使用菌株の純粋分離 種菌については使用菌株そのものの純粋性、培養工程で他菌株による汚染との 2 つの検討が必要である。ここに究明しようとする異常発酵についても、使用菌株に他の菌株が汚染混在しないことが確実でなければ、研究は混迷することが避けられない。一般に菌株を純粋にする方法は種々報告されているが、この場合に有効なものは micromanipulator、懸滴培養法、平板培養法による方法である。L-リジン生産菌は無孢子で運動性が無く、培養条件を適当にすれば単一の細胞となって孤立し、検鏡によって容易に識別できる。最良の方法は micromanipulator を使用することが望ましいが、種々の難点のために懸滴培養法を採用し、これに平板培養法を併用し繰り返し行なうことによって純化をはかった。

(a) 懸滴培養法による単細胞の分離：単細胞分離用の培地は、ブドウ糖 2.5%，NaCl 0.25%，CSL 3%，ビオチン 100 γ /l の組成のものをを用いた。この培地は検鏡を容易にするために一度煮沸殺菌後生じた沈澱物をザイツ濾過により取り除き使用した。菌を接種後温度 28° で振盪培養を 10 時間行ない、培養液を同様の培地で無菌的に稀釈し、細胞数を 10²/ml 程度になるようにする。これを通常行なわれている懸滴培養法により温度 28° で 24 時間培養を行なった。1 個の細胞から出発して増殖の行なわれた小滴は、殺菌した小濾紙片の角で無菌的に吸い取り、直ちに別に殺菌した上記培地に投入後温度 28° で 24 時間培養をした。増殖した菌はペプトン 1%，肉エキス 1%，NaCl 0.5%，寒天 2% の斜面培地 (pH 7.2) に塗布し、温度 28° で 24 時間培養後 5° の冷蔵庫で保存した。懸滴培養で小滴中にある 1 個の細胞は必ずしも増殖するとは限らず、ほぼその 2/3 が増殖した。

次にここに得られた純化菌株の L-リジン生産性について検した。すなわち糖蜜 (全糖濃度として) 約 10%，

これに反し異常発酵では 10 時間目までは菌の生育がわずかに見られるが、それ以後 50 時間目頃までは増殖をほとんど認めることができない。しかしさらに発酵を続けると急激に生育が始まり、80 時間目では乾燥体重量は約 30 mg/ml になる。したがって糖の消長も菌の生育とほとんど一致した関係で消費される。しかし L-リジンの生産蓄積は 15 時間目までには約 3 mg/ml であるが、さらに発酵を続けて菌が急激に増殖する時期になっても糖はいたずらに消費されるばかりで、L-リジンはほとんど蓄積されず最高 5 mg/ml 程度にしかならない。要するに正常発

第 1 表 懸滴培養法によって取得した
菌株の L-リジン生産性

菌株整理 No.	初発糖濃度 (%)	L-リジン (mg/ml)	対糖収率 (%)
T-1	10.2	24.5	24.0
T-2	"	24.1	23.6
T-3	"	22.5	22.1
T-11	9.6	22.8	23.8
T-12	"	23.2	24.2
T-13	"	21.9	22.8
T-21	9.6	23.3	24.3
T-22	"	22.9	23.9
T-23	"	22.7	23.6

第 2 表 平板培養法により分離した菌株
の L-リジン生産性

菌株整理 No.	初発糖濃度 (%)	L-リジン (mg/ml)	対糖収率 (%)
G-1	9.16	23.0	25.1
G-2	"	20.6	22.5
G-3	"	24.2	26.4
G-4	"	19.7	21.5
G-5	"	21.6	23.6
G-6	"	22.7	24.8
G-7	"	22.6	24.7
G-8	"	20.3	22.2
G-9	"	22.3	24.3
G-10	"	24.5	26.7
G-11	"	20.1	21.9
G-12	"	20.7	22.6
G-13	"	23.5	25.7
G-14	"	19.6	21.4
G-15	"	19.8	21.6
G-16	"	17.7	19.3
G-17	"	21.2	23.1
G-18	"	22.6	24.7
G-19	"	20.5	22.4
G-20	"	24.0	26.2

0.2%, K_2HPO_4 0.02%, KH_2PO_4 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, ビオチン 100 γ /l の組成のもの、これにさらに L-メチオニン、L-スレオニンを各 50 γ /ml を添加したものとの 2 種類を作り、両培地に G-10 を保存用斜面培地からとって生理食塩水で 3 回洗滌し接種した。この場合に培地中の菌含有量を約 20/ml になるようにしておいた。この菌濃度にした理由は、もし自然変異株が菌株中に混在していても 20 個の菌数中には混在されていないという仮定に立脚しているわけである。これを 1 ml ずつ、あらかじめ殺菌した試験管に無菌的に入れたものを 100 本ずつ作り、温度 28° で振盪培養を 48 時間行なった。別に親株である *M. glutamicus* 614 についても同様の方法で接種したものを 100 本ずつ作って対照とした。その

第 3 表 純化菌株 G-10 と *M. glutamicus* 614
との合成培地での生育

菌 株	実験 No.	ビオチン 添加培地	ビオチン, L-メチ オニン, L-スレオ ニン添加培地
G-10	1	(0)	(100)
	2	(0)	(100)
	3	(0)	(100)
	4	(1)	(100)
<i>M. glutamicus</i> 614	1	(100)	(100)
	2	(100)	(100)
	3	(100)	(100)
	4	(100)	(100)

() 内の数字は菌が生育した試験管の本数を示す。

NZ-アミン(カゼインの酵素による加水分解物) 1%, $CaCO_3$ 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 1% の培地を用い振盪培養を行い、培養 5 日目に L-リジンの生産量を測定した。その結果比較的生産量の高かった 3 菌株について再び懸滴培養法を行なって 3 菌株を得た。この操作をくり返して純化を行ない、各回に得られた L-リジン生産の結果を第 1 表に示す。

(b) 平板培養法による単細胞の分離 : 懸滴培養法によって単細胞分離を 3 回繰り返したのであるが、対象が細菌であり酵母のように大きくないので 1 個の細胞と見たものが、あるいは滴内に見落した他の細胞があったりして、1 個の細胞ではなかったという恐れもあるので、前記の操作で単細胞分離を行なったものをさらに平板培養法によって単細胞の分離をした。すなわち、ブドウ糖 1%, ペプトン 1%, 肉エキス 0.5%, NaCl 0.25%, 寒天 2% (pH 7.2) の培地 20 ml ずつを直径 9 cm のペトリーシャーに流し込み固化させる。これに懸滴培養で使ったと同様の培地で 10 時間培養した培養液を、殺菌水で希釈したものを 0.1 ml ずつまき、池田⁽⁷⁾らの報告にある方法により寒天上に均一に拡げる。これを温度 28° で 24 時間培養し聚落が約 10 個出現したシャーレから釣菌を行ない前記保存培地に塗布して保存する。これについて L-リジン生産性をしらべ、再び平板培養を行なうという操作を 7 回繰り返した。その第 7 回目の結果を第 2 表に示す。

すなわち L-リジン生産に関してはほとんど変化がなく、ここに得られた菌株は純化されているものと考えられる。

(c) 最少培地中での純化菌の生育 : 純化操作によって得られた菌がはたして純化されているかどうかをさらに確認するため、ことに親株 *M. glutamicus* 614 が混在していないことを確認するために最少培地での生育で確かめた。使用した菌株は G-10 である。最少培地はブドウ糖 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, 尿素 0.2%, K_2HPO_4 0.02%, KH_2PO_4 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, ビオチン 100 γ /l の組成のもの、これにさらに L-メチオニン、L-スレオニンを各 50 γ /ml を添加したものとの 2 種類を作り、両培地に G-10 を保存用斜面培地からとって生理食塩水で 3 回洗滌し接種した。この場合に培地中の菌含有量を約 20/ml になるようにしておいた。この菌濃度にした理由は、もし自然変異株が菌株中に混在していても 20 個の菌数中には混在されていないという仮定に立脚しているわけである。これを 1 ml ずつ、あらかじめ殺菌した試験管に無菌的に入れたものを 100 本ずつ作り、温度 28° で振盪培養を 48 時間行なった。別に親株である *M. glutamicus* 614 についても同様の方法で接種したものを 100 本ずつ作って対照とした。その結果を第 3 表に示す。

すなわち *M. glutamicus* 614 は上記最少培地に L-メチオニン、L-スレオニン、ビオチンの 3 者を添加した培地およびビオチンだけを添加した培地で生育が認められるが、*M. glutamicus* 901 の純化株は最少培地にビオチンだけを添加した培地では 1 本の例外を除いて生育が認められず、上記 3 物質を含有している培地中でだけ生育している。しかし 1 回の実験に用いた細胞の総数は約 2,000 個であるが、菌は増殖中に自然変異⁽⁸⁾を起すことが当然予想されるので、さらに多数の

細胞について試験を行なえば違った性質の菌が見出されないとも限らない。したがって G-10 のビオチンだけを添加した培地の第 4 回目の実験の試験管で 1 本だけ菌が生育したのは、純粋分離をした菌株中に発生した自然変異株に由来するものであると推察される。

(2) 発酵工程の無菌性 異常発酵の基因には工場現場で他の菌が汚染することにより起ることも考えられるので、発酵工程の無菌性を確かめることは異常発酵の基因追究のための重要な条件でもある。一般に大型発酵槽では特に雑菌汚染の危険性も増すので、発酵過程で無菌性が保たれているかどうかを 5 l ジャーファーマンターおよび 2 kl 槽について検討を行なったしだいと結果とを記述する。

ジャーファーマンターは 5 l 容の硬質ガラス製容器と附属品とよりなり、鏡板とガラス円筒との間には耐熱耐圧性ゴムパッキングを挿入して完全に洩れを防いでいる。これらの装置は完全に装備した後、内部に 1 kg/cm^2 G の空気を吹き込み水槽中に沈め各部の洩れの有無を検した後使用した。攪拌機用軸のグランド部はパッキングにより鏡板の上下の両側からシールして完全に密閉する。このパッキングは 1 発酵が終了すると毎回新しい物と取り替えるようにしてある。培地の殺菌には綿筒を含むすべての附属物と一緒に加圧釜中で温度 120° , 40 分間の殺菌を行なっている。2 kl 槽は不銹鋼製で、装備、附属物はジャーファーマンターとほとんど同じであるが、その他種母移送管、発酵液圧送管を設備してある。培地の殺菌にはまず発酵槽を空のまま生蒸気により附属物と一緒に温度 140° で 30 分間殺菌をする。その後培地を入れ再び生蒸気を使用して温度 120° , 15 分間の殺菌を行なう。空気濾過用綿筒は温度 140° , 30 分間殺菌後乾燥を行う。また発酵槽外部は常に清潔に保っておき、空気取り入れ口は工場の最も清潔な場所の高所にあり、清浄な空気を導入し、冷却水その他の使用水はすべて飲料用清浄水で、専用の深井戸から導いて使用している。

無菌性の保持のために、まず空気系統としては綿筒の詰め替え更新、綿筒殺菌、綿筒乾燥上の注意、殺菌綿筒の空気濾過能の検査、送気管内の清掃点検、各部分の漏洩の検査などを確実にしない、また使用空気は空気中の水分、油分の除去のために、ブラインにより冷却しさらにサイクロンにより油分の除去を行なっている。発酵槽については各附属物および缶体の完全性検査および槽内面の清掃などを絶えず行なっている。その他殺菌方法の完全性、添加物の完全無菌性を常に注意しながら現場操作を行なっている。

(a) ブドウ糖ブイヨン培地による無菌試験 5 l ジャーファーマンター、2 kl 槽両者とも、第 4 表に示す培地を入れ、前記方法にしたがって殺菌した後、菌を接種せずに通気攪拌試験を行なった。すなわち 5 l ジャーファーマンターでは攪拌 800 r. p. m., 通気 1 l/l/min , 2 kl 槽では攪拌 180 r. p. m., 通気 0.6 l/l/min の条件、つまり通常の L-リジン発酵と全く同一の条件で 3 日間運転を行なった。その結果を第 5 表に示す。すなわち培地の色調変化や混濁はなく、また検鏡の結果でも菌は認められなかった。この結果から発酵槽系統の無菌的完全性が確認されたので、第 4 表に掲げたブドウ糖ブイヨン培地を種母槽に入れて通気攪拌を行ない、まず種母槽の無菌性を確かめた後、移送管を通して発酵槽へ送り込み、種母移送管の無菌性を確かめた。

第 4 表 無菌試験用培地組成

ブドウ糖	0.5%
ペプトン	1.0%
肉エキス	0.1%
食塩	0.5%
フェノールレッド	0.0018%
pH	7.2

さらに各添加装置を通して、L-リジン発酵と同様の操作で発酵槽へ消泡剤、尿素などの発酵に通常使用する物質の添加を行ない、さらに通気攪拌を続けて添加装置系統の無菌性を検査した。その結果を第 5 表に示す。すなわち、どれも無菌状態を完全に保っていることが確認された。

(b) L-リジン生産培地を使用しての無菌試験 : L-リジン生産培地は糖蜜を主体とし、これに SBM の硫酸

第 5 表 無菌試験の結果

発酵槽の種類	無菌試験 の温度 ($^\circ\text{C}$)	発 酵 槽			種母槽より移送後			添加物添加後		
		色調の 変 化	混濁性	検鏡	色調の 変 化	混濁性	検鏡	色調の 変 化	混濁性	検鏡
5 l ジャー ファーマンター	28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	37	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2 kl 発 酵 槽	28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	37	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

表中 (-) は無菌試験の結果無菌試験の判定に合格したことを示す。

第 6 表 培地の蒸煮殺菌時間と無菌性

蒸 煮 殺 菌 時 間 (分)	200 l 種 母 槽						2 kl 発 酵 槽						5 l ジャーファーメンター					
	ブドウ糖 ブイヨン 培地		培 地		検 鏡		ブドウ糖 ブイヨン 培地		培 地		検 鏡		ブドウ糖 ブイヨン 培地		培 地		検 鏡	
	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°
	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°	28°	37°
5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
40													(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

表中 (-) は無菌試験の結果判定に合格したことを示す。

分解液を加えてあり、また種母培地には CSL, CaCO₃ などを混合してあり、ブドウ糖ブイヨン培地に比べて殺菌されにくいと考えられる。それでこれらの培地を用いて蒸煮殺菌試験を行なった。蒸煮条件は 5 l ジャーファーメンターでは加圧釜中で、温度 120° で 40 分間、また大型発酵槽では生蒸気を吹き込み攪拌を行い温度 120° で 30 分間殺菌し、殺菌中に時々試料として殺菌した培地を無菌的にとり、その 1 ml をブドウ糖ブイヨン培地 10 ml を入れた試験管に注入し、温度 28° および 37° の試験管振盪機で培養する。一方殺菌した培地そのものを同様に培養を行ない、3 日後に肉眼および検微鏡によって判定を行なった。その結果を第 6 表に示す。

すなわち培地の殺菌は、2 kl 槽では殺菌温度 120° で行なえば 5 分間の蒸煮で完全であることが明らかになった。しかし現在では念のために 10 分間行なっている。5 l ジャーファーメンターでは現行の 40 分間の蒸煮で完全に殺菌されている。

以上に記述したように、発酵工程での無菌性は確認された。

要

約

2 kl 槽で起った異常発酵の発酵経過を正常発酵のそれと比較したところ、異常発酵の場合には最初菌の生育がほとんど見られず、経時が進むと非常に旺盛に生育し、L-リジンはほとんど生産されない特徴ある経過を辿る。そこでこの基因追究のための先決条件としてまず使用菌株の純粋分離を、懸滴培養法と平板培養法を併用して繰り返すことにより行ない、純化菌について L-リジン生産性および最少培地を用いて純粋性を確かめ、特に親株である *M. glutamicus* 614 から完全に純化されていることを確かめた。さらに次に発酵工程中での雑菌汚染について発酵装置の完全性、殺菌条件などについて検討を行ない、完全に無菌的に発酵管理が行なわれていることを確認した。

- (1) D. L. Dewey, E. Work : *Nature*, **169**, 533 (1952).
- (2) B. D. Davis : *ibid.*, **169**, 534 (1952).
- (3) A. G. Debusk : *Advances in Enzymology*, **17**, 393 (1956).
- (4) 匂坂勝之助, 志村憲助 : 本誌, **31**, 110 (1956).
- (5) L. E. Casida : U. S. Pat., 2, 771, 396

- (1956).
- (6) S. Kinoshita, K. Nakayama, S. Kitada : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 128 (1958).
- (7) 池田庸之助 : 本誌, **32**, A-106 (1958).
- (8) 小田雅夫, 若林謙太郎, 大嶋泰治, 奥野敏男 : 醸工, **33**, 379 (1955).