〔農化 第 36 卷, 第 10 号, p.814~818, 1962〕

L-リジン発酵における異常現象 (第2報)*

原料および異常発酵液の諸性質

重 藤 稔 (協和醸酵工業株式会社富士工場)

昭和 37 年 3 月 26 日 受 理

L-リジン発酵における異常発酵の基因を明らかにするため, その先決条件として使用菌株を純化し, 発酵槽, 空気, 種母槽系統その他が完全に無菌的に操作されていることを確認したことは前報⁽¹⁾に記述した通りである. この純化菌株を使用した発酵でもやはり同じ異常発酵が起きたので, 原料面に何か異常発酵を誘起する基因が存在するのではないかと考え, 諸原料の試験を行なった. 原料のうち糖蜜についてはアセトンブタノール発酵で, その種類が発酵におよぼす影響に関して本江ら⁽²⁾の報告がある.

実 験 の 部

5l ジャーファーマンターおよび 2kl 槽の培地組成は第1報⁽¹⁾と同様である.

I. 原料の試験 まず異常発酵を起したものに使用した現場作製の脱脂大豆粕分解液⁽¹⁾ (以後 SBM 分解液と略す) と実験室で精密に作製した分解液との比較, および異常発酵を起した培地に使用した現場保存の pH 調整用アンモニヤ水, 尿素, 消泡剤 (White oil, Foamrex) について実験室保存のものとの比較を行なった.

(1) SBM 分解液その他の原料 SBM 分解液の分析表を第1表に示す. これら SBM 分解液及びアンモニヤ水, 尿素, 消泡剤を使用した発酵結果は第2表に示す.

第2表 SBM 分解液および各添加物を使用した発酵結果

使用原料	L-リジン (mg/ml)	対糖収率 (%)	乾燥菌体 重量 (mg/ml)
SBM { 現場で分解	43.2	20.1	23.2
分解液 { 実験室で分解	45.0	21.1	22.5
* { 現場保存	42.5	20.5	25.1
添加物 { 実験室保存	41.5	20.1	24.3

* アンモニヤ水, 尿素, 消泡剤

第1表 SBM 分解液の分析値

SBM 分解液	全窒素 (%)	アンモニ ヤ態窒素 (%)	還元性物質 (ブドウ糖換算) (%)
現 場 で 分 解	4.41	3.28	3.1
実 験 室 で 分 解	4.86	3.41	3.6

すなわち実験室で調製した SBM 分解液を使用した方がやや良いように見受けられるが, たいした差があるとはいえず, また異常発酵を起したものに使用した現場保存のアンモニヤ水, 尿素, 消泡剤と実験室保存のものとも差は認められず, これら原料は異常発酵の基因ではないと考えられた.

(2) 糖蜜

(a) 糖蜜のロット

第1図 使用糖蜜の L-リジン生産量に及ぼす影響

* Abnormal Phenomena in the L-Lysine Fermentation. Part II. Raw Materials used in L-Lysine Fermentation and Several Natures of Abnormal Fermentation Broth.

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

差の影響：従来、糖蜜は比島産の甘蔗廃糖蜜（以後糖蜜と略す）を使用していたのであるが、糖蜜のロット差による L-リジン生産量の変動は多少はあったが、問題にするほどのものではなかった。しかし異常を起した発酵に使用したものは新しく入荷した比島産のものであるので、この糖蜜と正常発酵の糖蜜との両方について 2 kl 槽及び 5 l ジャーファーマンターを使用して比較試験を行なった。結果を第 1 図に示す。

すなわち、糖蜜のロット差が顕著に現われ、以前に正常発酵で使用した糖蜜を使用した場合には今回も正常発酵となり、約 40 mg/ml 以上の L-リジンが生産されるのに反し、かつて異常発酵で使用した糖蜜の場合には、今回も同じく L-リジン生産量は非常に低下することが判明した。また異常発酵での発酵経過は第 1 報⁽¹⁾に前述した異常発酵と全く同様の経過をたどっており、菌の生育が一時停止した後に極度に旺盛な発育を示し、異常発酵の最大の要因は糖蜜にあるということが明瞭になったので、以後種々の検討を糖蜜に主体を置いて行なうことにした。

(b) 糖蜜の分析値：糖蜜に異常発酵の原因があると認められたので、その分析を行なった（第 3 表参照）。これだけの分析では正常発酵性と異常発酵性両糖蜜との間に非常に違った差は認められないが、後者が前者に比較して pH が低く、酸度が高いこと、全糖濃度が低いことおよび Brix が高いことが違っている。特に異常発酵性糖蜜 No. 3 は異常性が最も強かったものであるが、比重が高く、全糖が低い割に直糖が高いことが認められた。

第 3 表 糖 蜜 の 分 析 値

糖蜜の種類	pH	酸度 (ml)	比重 (20°C)	全糖 (%)	直糖 (%)	全窒素 (%)	アミノ 態窒素 (%)	アンモニ ャ態窒素 (%)	灰分 (%)	Brix
異常発酵性糖蜜-1	4.92	23.9	1.42	58.8	30.2	0.385	0.015	0.012	5.29	81.4
"	-2	4.81	22.1	1.40	58.4	0.368	0.021	0.018	4.80	83.9
"	-3	4.96	21.7	1.47	48.1	0.421	0.018	0.018	4.12	84.3
"	-4	4.99	22.8	1.39	56.2	0.336	0.020	0.016	5.58	82.9
正常発酵性糖蜜	5.26	18.9	1.44	60.1	30.5	0.383	0.026	0.019	5.52	78.8

分析方法 pH: 20 w/v% の糖蜜液を pH メーターで測定。酸度: 20 w/v% の糖蜜液を N/10 NaOH で中和し pH 7.0 になるまでに要した ml 数。比重: 20° の糖蜜 100 ml の重量より算出。全糖及び直糖: Bertrand 法。全窒素: Kjeldahl 法。アミノ態窒素: Van Slyke 法。アンモニャ態窒素: MgO 添加蒸留法。灰分: 500~650° で灰化秤量。Brix: あたご式手持屈折計で測定。

II. 異常発酵液の諸性質 前述のように異常発酵は使用する糖蜜の種類によって顕著に発性する場合があることが判明したが、異常発酵を起した発酵液は、その成分および菌自身に何らかの変化を起していると考えられるので、その発酵液自体および発酵液から分離した菌について検討を行なった。

(1) 5 l ジャーファーマンターを使用しての併行試験 異常発酵性糖蜜 No. 1 を使用し、2 kl 槽を用いて発酵を行ない、その工程途上で種母槽および主発酵槽から経時的に発酵液を採取し、無菌的に 5 l ジャーファーマンターに移して発酵を行なわせ、2 kl 槽との併行試験をすることにより異常発酵現象はどの段階から発生してくるかを検した。この併行試験は第 2 次種母以後の工程について行ない、第 4 表に示すように第 2 次種母用培地の蒸煮殺菌後の種母接種前のもの (S-0 hr)、第 2 次種母の 2 kl 槽への移送直前のもの (S-9 hr)、2 kl 槽培地の種母接種前のもの (F-0 hr)、2 kl 槽培地に種母接種直後のもの (F-0' hr)、2 kl 槽で発酵を 16 時間行なったもの (F-16 hr) を無菌的に採取して試験に供した。S-0 hr および F-0 hr については実験室で別に培養した種母を接種し、S-0' hr の試料は実験室内で 2 l 三角フラスコを使用して培養をして後正常発酵性糖蜜培地を入れた 5 l ジャーファーマンターに、また S-9 hr の試料は直ちに正常発酵性糖蜜培地を入れた 5 l ジャーファーマンターに接種し、また F-0' hr および F-16 hr の試料は、あらかじめ空のまま殺菌しておいた 5 l ジャーファーマンターに無菌的に移して発酵を行なった。これら併行試験で得られた最大乾燥菌体重量と最大 L-リジン生産量とを第 4 表に示す。

第 4 表 併行試験の結果

サンプル の記号	乾燥菌体 重量 (mg/ml)	L-リジン (mg/ml)
S-0 hr	23.0	45.3
S-0' hr	21.4	42.0
S-9 hr	20.1	42.2
F-0 hr	26.5	15.3
F-0' hr	27.1	14.3
F-16 hr	34.9	8.2

すなわち、第 2 次種母までには異常がないことを認めたが、2 kl 槽の主発酵培地については、それを 5 l ジャーファーマンターに採取し、別に実験室で培養した新しい種母を接種して発酵させても異常現象を起すことから、2 kl 槽そのものに異常があるのではなく、主発酵培地に異常が発生する要因があることが知られる。また、2 kl 槽で発酵中のある時期から異常現象が発生してくるわけではなく、全く初期から異常となる要素が含まれている

第 2 図 経時的に採取した異常発酵液のザイツ濾液の発酵試験

●—● L-リジン
×---× 乾燥菌体重量

第 3 図 異常発酵液のザイツ濾液への栄養物質添加後の発酵試験

●—● L-リジン ×---× 乾燥菌体重量

不足にも一因があると考えられ、その栄養源は SBM 分解液中に存在するものであろうと推定できる。

次に異常発酵液を経時的に採取し、これを 10% の接種量で新しく調製した正常発酵性糖蜜培地に接種し、振盪培養を行った。その 96 時間培養後の菌の生育度及び L-リジン生産量を第 4 図に示す。すなわち F-0' hr の発酵液を新しく調製した培地に接種すれば L-リジン生産量は 30.1 mg/ml であるのに対し、F-16 hr~F-62 hr の発酵液を接種すれば 3~11 mg/ml の生産量にしかならない。この時の乾燥菌体重量は F-0' hr の発酵液を接種したものでは 21 mg/ml であるのに対し、F-38 hr, F-62 hr のものでは 30 mg/ml 以上という非常に多い菌体量となっており、典型的な異常発酵の形態を示している。このことは、異常発酵液は広い意味での伝染性を持っているものと解釈され、一度異常発酵を起した発酵液中には同型の異常発酵を起す要因を内蔵しているといえる。

III. 発酵液から分離した菌株 異常発酵を起した時に発酵液中に生育している菌がどのように変化しているかを検するため、これらの発酵液から菌を平板培養法によって分離して取得し、分離した菌株について 2, 3 の実験を行なった。

第 1 報⁽¹⁾記述の純化菌株を使用し、2 kl 槽での発酵で発生した異常発酵の培養 44 時間目の発酵液から菌株の分離を行なった。分離には第 1 報⁽¹⁾記載の平板培養の培地を直径 9cm のペトリシャーレに 25 ml 入れ、これに上記発酵液を数段階に希釈した 0.1 ml をまきよく均一に拡げ、温度 28° で 24 時間培養した後で生じた聚落

ことが知られる。これは前述したように、培地、なかんずく糖蜜の影響であることがここでもいえるのである。しかし F-16 hr でさらに異常の程度が増しており、発酵液の異常性は発酵時間とともに増大していくようである。

(2) 異常発酵液の菌体除去液 異常発酵液の性質を知るために、発酵液を菌と濾液に大別して検した。すなわちそれぞれ違った時期に 2 kl 槽から採取した異常発酵液のザイツ濾液 20 ml を 500ml 容坂口フラスコに無菌的に入れて、これに別に培養した新しい種母を接種し振盪培養を行なった。その結果を第 2 図に示す。すなわち、2 kl 槽から種母接種前 (F-0 hr) にとった試料のザイツ濾液では約 17 mg/ml の L-リジン生産が見られるが、F-16 hr, F-38 hr および F-62 hr の各時間に採取した試料のザイツ濾液では L-リジン生産量は非常に低い。乾燥菌体重量は F-0 hr のものでは 12 mg/ml であるが、それ以後のものでは 10 mg/ml 以下であり、菌の生育が悪い。

次にこのザイツ濾液に SBM 分解液を 0.8% (SBM 乾物換算量) になる

第 4 図 異常発酵液を正常発酵性糖蜜培地へ接種した時の菌の生育と L-リジン生産量

●—● L-リジン
×---× 乾燥菌体重量

ように添加した区とビオチンを 100 γ /l になるように添加した区 (ただしザイツ濾液中にもともと含まれているビオチンは考慮に入れない) との 2 つについて検した。その結果を第 3 図に示す。すなわちビオチンを添加しても全然影響はないが、SBM 分解液を添加すれば菌の生育が行われるようになり、したがって L-リジン生産は 20 mg/ml 程度行われている。このことは異常発酵の発育異常現象に関しては栄養源

第 5 図 異常発酵液から分離した菌の L-リジン生産能

第 5 表 異常発酵液から分離した菌株の L-リジンおよび L-グルタミン酸生産性

菌株整理 No.	L-リジン (mg/ml)	L-グルタミン酸 (mg/ml)	菌株整理 No.	L-リジン (mg/ml)	L-グルタミン酸 (mg/ml)
1	痕跡	24.4	16	21.8	痕跡
2	"	35.3	17	痕跡	23.8
3	"	30.1	18	23.3	痕跡
4	1.2	28.3	19	1.8	"
5	1.7	34.7	20	23.7	"
6	痕跡	31.6	21	3.7	"
7	2.4	30.0	22	22.7	30.1
8	2.1	30.0	23	17.6	33.7
9	21.8	痕跡	24	11.2	痕跡
10	2.4	27.3	25	21.5	"
11	2.3	32.4	26	12.8	"
12	20.9	痕跡	27	14.0	"
13	4.0	29.2	28	22.5	"
14	1.4	32.2	29	27.1	"
15	1.4	31.4			

の釣菌を行ない種々実験に供した。

(1) L-リジン生産試験 : 第 1 報⁽¹⁾と同様の種母培地 20 ml を 250 ml の三角フラスコに入れ, 分離した菌株を 1 白金耳接種後, 温度 28° で 24 時間振盪培養をした後, 糖蜜, SBM 分解液及び CaCO₃ を含む生産培地中に 10% の種母量で接種し, 96 時間振盪培養を行なった. その結果の L-リジン生産量を第 5 図に示す. すなわち, L-リジン生産性が 3 mg/ml 程度の所にピークがある菌株と, 21~24 mg/ml のところにピークがある菌株との 2 種類の菌株群に大別することができ, 2 種類あるいはそれ以上の異なった性質の菌株が, 異常発酵液中に明らかに混在していると認められる. 特に L-リジン生産量が極端に低い菌株が, 全菌株中の約半数を占めていることが注目される.

(2) L-グルタミン酸生産試験 : これらの菌株から無作為に 29 株を抜き取り, それらの L-リジン生産量と L-グルタミン酸生産量とについて検した. L-グルタミン酸生産試験用培地には, ブドウ糖 10%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%, KH₂PO₄, K₂HPO₄ 各 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.025%, MnSO₄·7H₂O 0.001%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, ピオチン 107/l の組成のものをうい, L-グルタミン酸の定量は L-グルタミン酸脱炭酸酵素を用いた検圧法⁽³⁾によった. 結果を第 5 表に示す.

すなわち, 分離菌 29 株中 8 株が L-リジンを正常に生産して L-グルタミン酸をほとんど生産しないが, 14 株は逆に L-リジンをほとんど生産せずに L-グルタミン酸を多量生産している. 2 株では L-リジン及び L-グルタミン酸両者ともほとんど生産されず, 2 株は両者を生産し, 3 株は L-グルタミン酸の生産はしないが L-リジン生産量も低かった. 要するに L-リジン生産性の低下した菌株は L-グルタミン酸の生産性が高まっており, この現象は親株である L-グルタミン酸生産菌への復帰変異を推定させる.

考 察

特定の糖蜜を使用すると異常発酵となることがわか

ったが, 分析の結果, 異常発酵性糖蜜は比重及び Brix が高く, 全糖が低い割に直糖が高いことが認められた. 比重は糖濃度を表わす 1 つの目安ともなるが, 非糖有機物は糖よりも比重が高く, したがって比重が高い現象は非糖有機物の含量が高い場合にも起り得る. また Brix は製糖工業では乾物 (solid matter) の重量を表わす⁽⁴⁾ものとされている. したがって全糖と Brix とをあわせて検すれば solid matter 含量の高低が推定されるわけである. 糖蜜は貯蔵中に生物学的化学的变化を起し全糖, 蔗糖の減少, 転化糖の増加が起ることがあると報告⁽⁵⁾されているが, 異常発酵性糖蜜は貯蔵中に変化し悪化したものではないとも考えられる. 糖蜜の分析は多くの人によって行なわれているが⁽⁶⁻⁹⁾, 同一産地の糖蜜でも多数の小さい製造所でできたものを 1 個所に集荷するものであり, その品質は毎回異なるものである. その他甘蔗の種類, 収獲時期, 製造工程の差によって同一地方の糖蜜でもその成分は非常に変動するわけである. 河盛は同一の菌を使用して 20 種類の糖蜜について発酵試験を行ない,

同一地方の糖蜜でも発酵が良好な場合と不良な場合とがあることを確かめており、結局 L-リジン発酵での異常現象の最大の要因は糖蜜にあると考えられる。

一方、異常発酵液のザイツ濾液を使用した実験から、濾過性物質、たとえばバクテリオファージの影響ではないかとも考えられ、木下ら⁽¹⁰⁾のアセトンプタノール発酵におけるバクテリオファージによる G-型異常発酵とやや類似した経過をたどる。しかし異常発酵液のザイツ濾液に SBM 分解液を添加しておけば正常発酵になることから、バクテリオファージなどの濾過性因子に由来するものではなく、何か栄養源の不足も 1 因となっているのではないかと考えられる。

また異常発酵液を新しく作製した培地に無菌的に接種すると同型の異常発酵を起すことから、異常発酵はその性質を伝えることが認められ、また、2kl 槽中で発酵経時が進むにつれて異常性が増大することから、上記の栄養源不足ということだけでは説明できず、また雑菌汚染でもないとするれば、結局異常発酵液中に存在する菌の生理異常に由来するものではないかと考えられる。そこで異常発酵液から菌を分離して L-リジン及び L-グルタミン酸の生産能を検したところ L-グルタミン酸生産能の高い菌が多数見出された。

もともと L-リジン生産菌 *M. glutamicus* 901 は L-グルタミン酸生産菌 *M. glutamicus* 614 の紫外線照射により得られた栄養要求変異株であるため、親株である L-グルタミン酸生産菌への復帰変異を起したためのものであると解釈される。

要 約

L-リジン発酵において第 1 報⁽¹⁾記載の純化菌株を使用した場合にも異常発酵を起したので、基因追究のために正常発酵および異常発酵に使った諸原料について比較試験をしたところ糖蜜に顕著な差が認められ、ある特定の糖蜜を使うと 2kl 槽でも 5l ジャーファーマンターでも異常発酵が起った。

糖蜜について異常発酵性のものと正常発酵性のものとの分析上の比較を行なったところ明瞭な差は認められなかったが、顕著な異常発酵を起す糖蜜では Brix が高い割に全糖濃度が低く、直糖濃度が高いことが認められ、この性状は糖蜜を長期間貯蔵した時に変化してくる性状に類似していた。

異常発酵液を 2kl 槽から経時的に採取し、5l ジャーファーマンターを使用して併行試験を行なった結果、異常現象は発酵時間 16 時間目ごろから始まり、2kl 槽での発酵経時が進むにつれその程度がひどくなることが明らかとなった。

異常発酵は伝染性を持ち、異常発酵液を新しく調製した培地に入れると同型の異常発酵を起すことが判明したが、これはバクテリオファージなどの濾過性物質のためではなく、菌の変調のためであることがわかった。

異常発酵液から分離した菌株は大半の菌が L-リジン生産性を失い、逆に L-グルタミン酸生産性を持っていることが判明した。これは親株 (L-グルタミン酸生産菌) への復帰変異を暗示するものである。

終りに臨み終始御懇篤な御教示を賜った東京大学池田庸之助教授、九州大学本江元吉教授、岩田久敬教授に心から御礼申し上げます。また発表を許可された協和醸酵工業株式会社社長加藤弁三郎博士に御礼申し上げます。

(1) 重藤 稔 : 本誌, 36, 809 (1962).

(2) 本江元吉, 長田 健 : 本誌, 32, 585 (1958).

(3) 松原 功, 森田皓暉, 木下祝郎 : 醸協誌, 17, 584 (1959).

(4) L. Guilford, D. Sc. Spencer et al. : Cane Sugar Handbook, 1952, p. 524.

(5) L. Guilford, D. Sc. Spencer et al. : *ibid.*, 1952, p. 251.

(6) L. A. Underkofler et al. : *Industrial Fermentation*, 1, 75 (1954).

(7) 松原 功, 森田皓暉, 木下祝郎 : 醸協誌, 18, 73 (1960).

(8) Dr. H. Olblich : *Die Melasse*, 1956, p. 9.

(9) 丸田芳樹, 松原 功 : 醸協誌, 15, 187 (1957).

(10) 木下祝郎, 松沢辰男, 深谷俊忠, 志賀昭夫 : 醸協誌, 8, 333 (1950).