The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ペニシリン生産菌に関する研究 (第3報)

Pen. chrysogenum H512 の系統図並びにコロニー形態とタンク培養に於ける Productivity との関係について

野口　祐一，荒尾　修，大庭　俊治 (協和醗酵工業株式会社)

Studies on Penicillin-producing Strain (III)

The Genealogy of High Penicilling-producing Series of *Pen. chrysogenum* H512, and the Relation between the Type of Colony and the Productivity in Tank Culture

Yuichi NOGUCHI, Osamu ARAO, and Shunji ŌBA
(Kyowa Fermentation Industry Co. Ltd.)

1) In the line of descent of *Pen. chrysogenum* H 512, there have been more substantial gains in ability to produce penicillin in the UV series than in non-irradiated control. UV irradiation seems to be effective in selecting high penicillin-producing strains of "L"-type in shake-flask culture.

2) Through six generations of "L"-type on CZAPEK-DOX agar medium, there has been no remarkable change in productivity. But a little better growth was observed along the line of descent since the first few generations.

3) "M"-type was found to be more suitable for the production of penicillin in submerged fermentation with high agitation and aeration than "L"-type.

緒　　言

前報[1)2)]迄に著者等は *Pen. chrysogenum* Q176 *Pigmentless saltant* を原株とし，紫外線照射で得た *Pen. chrysogenum* H512 を〔H〕，〔M〕，〔L〕，〔A〕の4つの Type に分け，これらの Colony の形態，性状並びに継代による変化，分離方法等について比較検討した．ここでは実際に行なわれてきた菌管理の方法，これらの方法で Screening された菌の Shaking culture に於ける Productivity 及び菌の Type とタンク培養に於ける Productivity との関係について報告する．

実　験　の　部

1．菌管理法並びに生産菌の系統図

実験方法

分離の方法は Monocolony，紫外線照射，高単位醗酵ブロスよりの Monocolony screening の方法を採用した．その方法は前報記載の方法に準ずる．

実験結果

Screening の方法，生産菌の系統図並びにこれら菌株の Productivity を Fig. 1，Table 1 に示す．Fig. 1 に示される Genealogy は Q176 *Pigmentless saltant* を原株とし，Screening により優良株として選ばれたものであるが，その経路の殆んどが紫外線による事は注目に価する．

一般にペニシリン醗酵では，振盪培養で高単位生産菌は生育が余りよくなく，Sporulation が Light であると云う事が認められている．吾々が4大別した〔H〕，〔M〕，〔L〕，〔A〕の中でも，Albino type を除けば Sporulation が最も悪い〔L〕type が Shaking culture では安定した高単位生産菌である事を認めた．

〔L〕type の菌株を Czapek-Dox agar medium に継代する時，Table 2 に示す如く Productivity は1代から6代迄ほとんど変化なく，極めて安定しているが，寒天培地の生育は稍々良好となる．Fig. 2 に1代と6代の比較を示す．従つて紫外線照射は若し照射しなければ生育が良好となる傾向を抑制し，常に〔L〕type のものの中から Shaking culture に適した高単位生産菌を選び出せると云う点で有効と思われる．

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

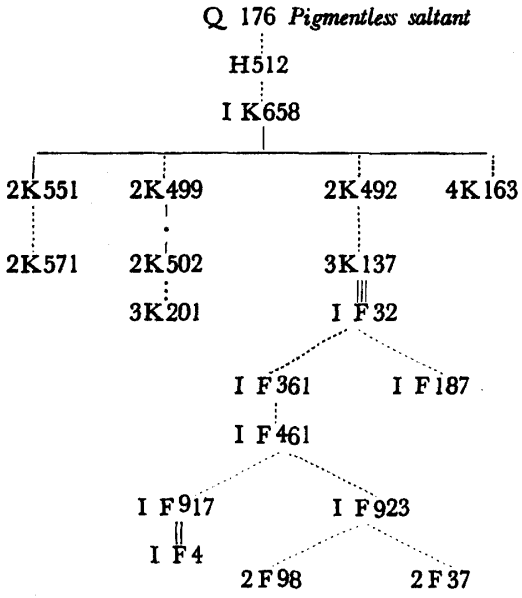

Fig. 1. Genealogy of *Pen. chrysogenum* H512.
—— Indicates selection without treatment.
..... Indicates selection following 2537Å UV irradiation.
═══ Indicates selection from broth.
═══ Indicates streak of tank broth on agar medium.
- · - Indicates direct inoculation from B to B unit.

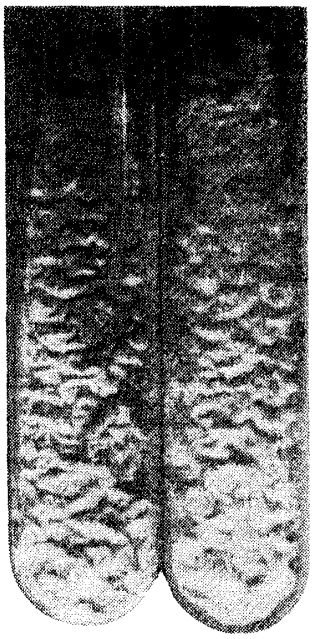

Fig. 2. Comparision of 1st and 6th generation.
Right : 1st generation.
Left : 6th generation.

Table 1. Productivity and productivity distribution in *Pen. chrysogenum* H512 series.

Strain	A unit u/ml	B unit u/ml	Potency u/ml					Range u/ml	Average u/ml	No. of colonies
			<1600	1600 ~1900	1900 ~2200	2200 ~2500	>2500			
H512	2530	2260	5.3%	39.5	47.4	7.8		1490~2320	1940	38
1K658	2040	2490		20.8	60.0	19.2		1700~2400	2090	135
2K492	2100	2060	2.2	31.8	52.7	12.1	1.1	1510~2540	2000	91
3K137	2018	1920	7.9	50.0	36.8	5.3		1270~2430	1850	38
1F32	—	1700	32.4	48.5	16.2	2.9		1110~2300	1710	68
1F361	—	1670	46.2	44.2	9.6			1240~2120	1610	52
1F187	2110	1470	12.1	29.0	41.7	11.2	6.0	1390~2880	1910	107
1F461	1835	2080		35.4	41.4	18.2	5.0	1658~2612	2090	101
1F917	2140	2100		15.2	20.7	20.7	43.1	1744~3516	2400	58
1F923	2005	2008	8.5	40.2	35.9	13.7	1.7	1240~2530	1900	117
2F37	2100	2080	15.2	22.8	54.5	7.5		1510~2270	1940	66
2F98	2080	2340			9.1	54.5	36.4	2060~2830	2440	44
1F4	3500	1730	5.9	27.9	27.9	16.2	22.0	1253~3294	2185	68
2K499	2000	2690								
2K502		2380	3.6	32.2	42.8	17.9	3.6	1520~2590	2010	56
2K551	1980	2000								
2K571		2230	8.3	63.1	28.1			1320~2180	1810	57
4K163	1862	1960	29.2	47.2	23.6			1440~2480	1730	89

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 2. Changes of productivity in 6 generations of *Pen. chrysogenum* H512.

Generation	I	2	3	4	5	6
Relative productivity	100 *	110	91	91	107	102

* 2100 u/ml.

2. 〔M〕, 〔L〕タイプ菌株のタンク培養に於ける Productivity の比較

〔H〕type の菌は Sporulation が極めて heavy で A, B unit とも Productivity が低く, 反対に〔A〕type のものは生育が極めて不良でいずれも生産条件には適しない. 〔L〕, 〔M〕type の菌は A unit では両方とも高単位生産菌であるが, 〔L〕type のものは A, B unit の Productivity の差が比較的少ないのに対し, 〔M〕type のものは大きい.

タンク培養では通常米培地の胞子 (B, C unit) を直接シード培地に植えるわけであるが, 試験室的には最終的に B, C unit の Productivity でその菌の優劣が決定される. 又普通の Screening 方法では〔M〕type の出現頻度は極めて少なく, たとえ現れたとしても A unit から Bunit にする時に著しく Productivity が低下するために, 吾々は生産に使用する事を差控えてきた.

High agitation, aeration に於いてフィーディング方式によるペニシリンの生産では, その培養条件は Shaking culture と著しく相違している.

今, 〔M〕, 〔L〕type に属する2つの菌株について, タンク培養に於ける Productivity を比較した結果は次の如くである.

実験方法

菌株：1K322, 1K268.

培地：シード培地は Glucose 4.0, Corn steep liquor 6.0 (vol), $CaCO_3$ 1.0, $NaNO_3$ 0.3%, 生産培地は Glucose 3.5, Corn steep liquor 6.0 (vol), $CaCO_3$ 1.0, $NaNO_3$ 0.3, 1 KH_2PO_4 0.07, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0025%, pH は NaOH で5.8に adjust する.

培養条件：シードは200 l 種母槽に培地100 l を入れ, 両菌の C unit を植菌する. 培養は等量通気で24°C, 37時間行なう. 本培養は2KL醗酵槽に培地1200 l を入れ, 回転数240r.p.m., 等量通気で培養する. 培養温度はシード同様24°Cである.

培養中 Precursor として Phenyl acetic acid の20%Na塩を10時間より5時間置きに0.05%宛添加する. 又糖消費後30%葡萄糖溶液を毎時 1l, 更に22時間より大豆油 200ml を毎時フィードした. pH は 7.2 を越える時20% H_2SO_4 で7.2に adjust する.

実験結果

両菌の A, C unit の Productivity は Table 3 に示す如くである. 37時間培養で最も著しい相違は菌体量で, 〔M〕type のものが明らかに〔L〕type のものより生育が旺盛である. pH も僅かに高い. 糖利用は殆んど差を認めなかつた(Fig. 3).

本培養でも菌体量は明らかに〔M〕type の方が〔L〕type より多く, 見掛けの最高菌体量が前者の 48% (35時間)に対し後者は40%(45時間)である. 1K322 培養の場合 Glucose は22時間より107時間迄に86l,

Table 3. Production of IK322 and IK268.

	Productivity u/ml		Colony type
	A	B	
1K322	2460	2280	L
1K268	2310	1800	M

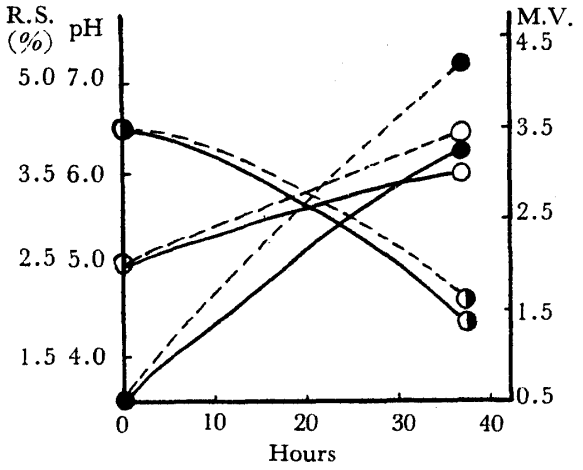

Fig. 3. Chemical changes of seed culture.
●——● Packed mycelium(ml/10ml broth)
○——○ pH.
◑——◑ Residual sugar.
—— 1K322……1K268.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

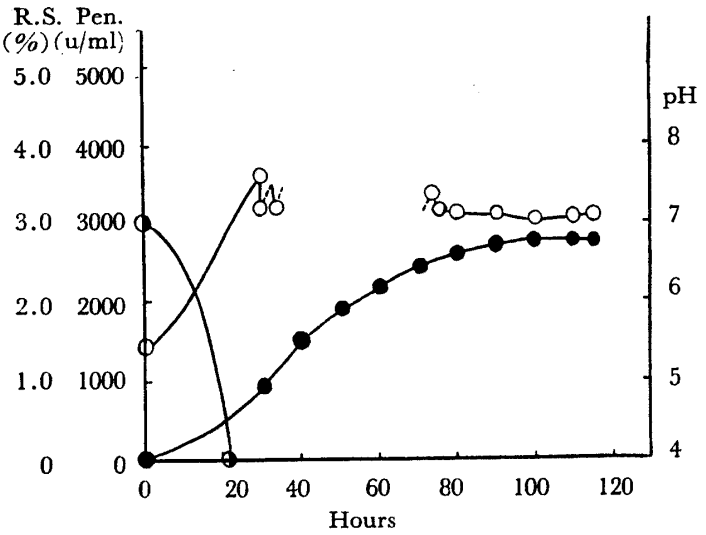

Fig.4. Chemical changes of penicillin fermentation with added glucose and soybean oil by strain 1K322.

●——● Penicillin u/ml.
○——○ pH.
◑——◑ Residual sugar.

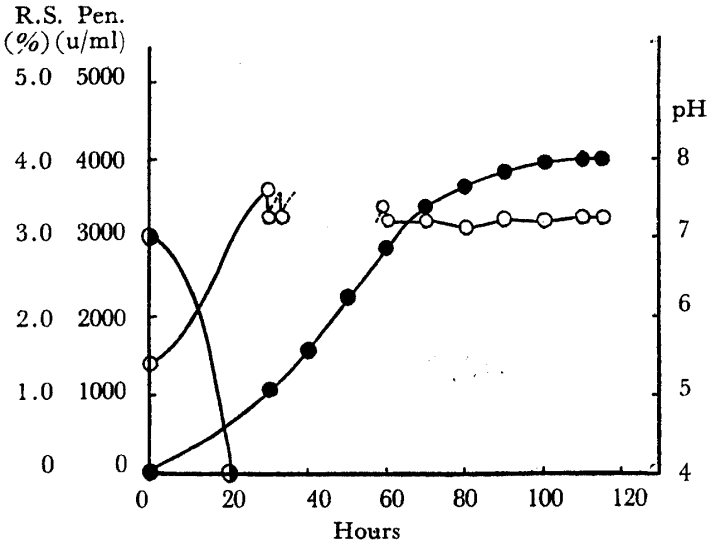

Fig.5. Chemical changes of penicillin fermentation with added glucose and soybean oil by strain IK268.

●——● Penicillin u/ml.
○——○ pH.
◑——◑ Residual sugar.

大豆油はフィード以外にも若干消泡剤として添加したため総量22.3 *l*（1.86%）使用した．一方1K268を培養する時は Glucose solution を21時間より115時間迄に95 *l*，大豆油は総量22.7 *l*（1.89%）フィードした．pH調節のために使用した20% H_2SO_4 量は前者では30乃至67時間迄の間に35 *l*，後者の場合26乃至80時間迄で45 *l* 使用した．

経時的培養力価はFig. 4，5に示す如く，〔M〕type の 1K268 の方が〔L〕type の1K322よりもタンク培養に適している事が判る．

考　　察

紫外線照射は目的に適つた優良変異株を分離すると云う以外に，菌管理上これを繰返し行なうと云う場合が多い．吾々が Shaking culture test で選んだ優良菌株もその殆んどが紫外線照射によつて選ばれている．BACKUS, STAUFFER[3] は2，3代の紫外線照射で特に顕著な改良が認められなくても，数代繰返し行なえば紫外線を照射しないものに較べて常に better である事を認めている．又，彼等が使用した *Pen. chrysogenum* Q176 は必ずしも Homogenous entity のものでなく，Colony の大きさから Several components の Balanced mixture である事を推定している．著者等も *Pen. chrysogenum* H512に〔H〕，〔M〕，〔L〕，〔A〕の4 type ある事を認め，紫外線照射は〔L〕type のものの中から Shaking culture に適した高単位生産菌を選ぶのに有効な手段である事を推定した．

Shaking culture で菌株の Screening をすると云う事は，Shaker とタンク培養の培養条件の相違よりも菌自身の Productivity が決定的な Limiting factor である事を暗黙の裡に認めている場合であるが，High agitation, aeration の培養条件に於けるフィーディング方式によるペニシリンの生産では，Shaker test で Screening した〔L〕type の高単位生産菌よりも，〔M〕type に属する菌の方が遙かにタンク培養に適している事を認めた．

要　　約

1．Shaking culture による Screening では，優良菌株と見做されるものはその殆んどが紫外線照射によつて選ばれている．紫外線照射は〔L〕type の中から高単位生産菌を選ぶのに有効な手段と思われる．

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

2. [L]type の菌を Czapek-Dox agar medium に継代する時，少なくとも6代迄は Productivity は変化なく維持される．唯，僅かではあるが寒天培地上の生育が良好となる傾向がみられた．

3. Shaking culture で高単位生産菌である[L]type の菌は，通気攪拌のタンク培養では必ずしも優良でなく寧ろ[M]type の菌の方が高単位生産菌である事を確認した．

終りに臨み，本研究の発表を許可された加藤社長，終止御指導を賜りました渡辺専務，鎌田部長に感謝の意を表します．又本報告の御校閲を戴いた大阪大学照井教授に厚く感謝致します．

文　献

1) 野口，荒尾：本誌，**39**, 61, (1961).　2) 野口，荒尾：本誌，**39**, 66, (1961).　3) BACKUS, M.P. and STAUFFER, J.F.: Mycologia, **47**, 429 (1955).

(昭和35, 9, 8受付)

沢庵漬着色剤の変色現象に関する研究 (第4報)

変色細菌の生理的性質について (その2)

芥　田　三　郎 (兵庫県立農業試験場)

Studies on the Discoloring Phenomena of Yellow Pigments for Radish Pickles (Takuan-zuke) (IV)

On Physiological Properties of Yellow Pigment-discoloring Bacteria (2)

Saburo AKUTA (Hyogo Pref. Agric. Experiment Station)

Taxonomic studies on special physiological properties of yellow pigment-discoloring bacteria were continued, and these strains were then identified according to the BERGEY's Manual (1957) as follows.

1. N1, N2, N3-6C: *Pseudomonas synxantha*
2. N12-2: *Ps. geniculata*
3. N14: *Ps. incognita*
4. N11: *Ps. convexa*
5. N4, N5C, N5L: *P. mildenbergii*
6. N7: *Ps. aeruginosa* (achromogenic variety)
7. T18: *Ps. riboflavina*
8. T19: *Xanthomonas* sp.
9. T20: *Alcaligenes viscolactis*
10. T22-2-1A, T24-1A: *Microbacterium lacticum* (gelatin liquefying variety)
11. T27, T28: *Micrococcus varians*
12. T29B, *Bacillus circulans*
13. T42B, Intermediate species of *Bacillus alvei* and *Bacillus circulans*

はしがき

前報[1]に引続き，変色細菌の生理的性質に関する特殊な事項について分数学的研究を行ない，BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (7 edition, 1957) に従つて種属決定を行なつたのでその成績について報告する．

実験成績

1) 芳香族化合物の資化性：DNN の変色に関連し，これが炭素源として資化されるか否かを見るため，有馬等[2]に倣らつて STANIER's medium を使用して他の芳香族化合物と共にその資化性を検定した結果は Tab. 1 の通りである．

NII-Electronic Library Service