要 約

細菌 α -アミラーゼの活性が光存在下, FR の共存によって阻害される事実を, FR および FMN, FAD の分解と結びつけて検討した. 酵素活性の阻害は FR だけでなく FMN, FAD によっても与えられるものであり, しかも本阻害には B₂ 側鎖部分の光分解産物が関与しないことを知るとともに, isoalloxazine 核をもとにえられた Lf, Lm が作用時の pH 条件によって特徴的な阻害性を現わすことを知った. さらに光照射時における Lf, Lm の生成およびその酵素活性阻害を量的に捕えることによって, α -アミラーゼの至適 pH では FR 自身が酵素に直接触媒的に作用し, 酵素の活性を阻害していることをおおよそ知ることができた.

終りに御指導いただいた恩師有山 恒教授ならびに FMN 結晶をいただいた京都大学 清水 祥一助教授, FAD 結晶をいただいた名古屋大学 八木 国夫助教授, わかもと製薬株式会社と泉屋正一氏に深甚の謝意を表します.

(1) 曾根清秀 : 本誌, 33, 1119 (1959).	糧, 5, 97 (1952).
(2) 曾根清秀 : 本誌, 36, 7 (1962).	(8) 清水祥一 : ビタミン, 6, 757, 761 (1953).
(3) 和田津る, 深井千晴, 桜井芳人 : 栄養と食糧, 5, 12 (1952).	(9) 和田津る, 桜井芳人, 二国二郎 : 栄養と食糧, 6, 3 (1953).
(4) H. Theorell : <i>Biochem. Z.</i> , 279, 186 (1935).	(10) 深町千晴, 桜井芳人 : ビタミン, 7, 939 (1954).
(5) 増田 亨, 沢 陽一, 浅井満子, 桑田 智 : 薬誌, 75, 802 (1955).	(11) A. Kocent : <i>Chemické Listy</i> , 47, 195 (1953).
(6) H. Fuwa : <i>J. Biochem. (Japan)</i> , 41, 583 (1954).	(12) R. Kuhn, T. Wagner-Jauregg : <i>Ber.</i> , 66, 1950 (1933).
(7) 和田津る, 深井千晴, 桜井芳人 : 栄養と食	

〔農化 第 36 卷, 第 1 号, p.18~23, 1962〕

Bacillus colistinus Koyama の生産する抗生物質

コリスチンについて (第 1 報)*

培養条件の検討 (I)

森 戸 敏 明 (万有製薬株式会社)

昭和 36 年 5 月 8 日 受 理

I) 緒 言

Bacillus colistinus Koyama の生産する抗生物質コリスチンについては小山^(1,2), 小田, 上田⁽³⁾, 栗原, 鈴木⁽⁴⁾の報告がある. 当社において藤正政人氏より譲り受けた原菌よりコリスチンを生産するに当り, 確たる培養条件, 精製法及び理化学的性質等が明らかでなかったため, それらについて検討した. 本報においてはまずその培養条件の検討の結果を報告する.

II) 実 験

I. *Bacillus colistinus* Koyama について コリスチンを生産する目的のため本菌の性状を調べたところ次のようであった. すなわち, 運動性桿菌で, 単独であり稀に連鎖をなす. 大きさは $0.5 \sim 1.0 \times 2.0 \sim 5.0 \mu$ である. 染色はグラム陽性で, 胞子は球状, 中存性である. 澱粉を加水分解する. ガスを発生し, 糖類を加水分解して有機酸類を生成する. 酸素を必要とする通性好気性菌である.

本菌の各種培養基での発育状態は第 1 表の通りで, 普通寒天, ブドウ糖寒天, 麦芽汁, Stansly's⁽⁵⁾ 培養基及び Stansly's 麦芽培養基での発育は良好である. 以後コリスチン生産のための検討にはブドウ糖寒天を使用して種々の条件を調べることにする.

II. 培養条件の検討 [I] 培養条件の検討において下記の要領で振盪培養及び力価検定等を行った.

* Antibiotic Colistin from *Bacillus colistinus* Koyama. Part I. Studies on the Culture of *Bacillus colistinus* Koyama (I).

By Toshiaki MORITO (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.)

第1表 各種培養基の発育状態

培 養 基	発 育 状 態
普 通 プ イ ヨ ン	菌膜を生成, 殆んどガスを発生せず, 菌は沈降する.
普 通 寒 天	灰白色, 生育良好.
ブドウ糖ブイヨン	菌膜を生成, ガスを発生, 菌は沈降する.
ブドウ糖寒天	光沢あり, 半透明, 生育良好.
日本薬局方 細菌用ブイヨン	菌膜を生成, ガスを発生, 菌は沈降する.
同 上 寒 天	半透明, 生育不良.
麦 芽 汁	生育良好, 糊状となる.
Stansly's 培 養 基*	生育良好.
Stansly's 麦芽培養基**	生育良好, 糊状となる.
マーサン培養基**	生育不良.
クラインスキー培養基 (斜面寒天)	透明, 生育不良.

* (5) ** Stansly's 培養基に麦芽 1% 添加したもの *** (6)

振盪機: 振幅 3cm, 振盪数
150 r.p.m. 往復型. 培養フラ
スコ: 坂口式 500 ml 振盪フラ
スコ. 培養液量: 100 ml. 力価
検定: 抗生物質基準に従う.
培養方法: *Bacillus colistinus*
Koyama をブドウ糖寒天に
30°, 3日間培養し, 寒天上に発育
した菌苔約 5 mm² を各種培養
基に接種し, 所定の温度 (各実
験にて述べる) において培養,
各時間後 (各実験にて述べる)
の pH 及び力価を測定する.

1. 各種培養基による培養 藤正氏より指示された小山氏培養基 A 及び B (以後培養基 [I] と呼称する) について, 前記ブドウ糖寒天上に発育した菌苔約 5 mm² を接種し, 27~28° にて振盪培養, そしてまた静置培養を行ったところ, 短時間に pH が 4.7~4.8 となり, 菌の発育も悪く, 24~35 時間において約 1 億個体/ml であった. 48 時間, 72 時間後にも, また静置培養の場合 7 日後にも菌の増殖はみられず, 培養の各時間における力価検定の結果は零であった.

小山氏培養基 A: 粉末肉エキス 0.3%, ペプトン 1%, ブドウ糖 2.5%, 第一磷酸カリ 0.1%, 硫酸第一鉄 0.002%, 硫酸マグネシウム 0.1%, 120°, 20 分間滅菌後 pH 6.5.

小山氏培養基 B (培養基 [I]): 肉エキス 0.25%, ペプトン 0.5%, 硫安 0.5%, 粗製ブドウ糖 2%, 第一磷酸カリ 0.05%, 硫酸第一鉄 0.001%, 硫酸マグネシウム 0.05%, 硫酸マンガン 0.001%, 食塩 0.2%, 滅菌 120°, 20 分間後 pH 6.5.

第2表 各種培養基の検討結果

No.	培 養 基	pH	力 価
1	[I]	4.7	0
2	[I] + CaCO ₃ 1%	5.8	3,200 u/ml
3	[I] + K ₂ HPO ₄ 0.2%	4.7	0
4	[I] + K ₂ HPO ₄ 0.3% + Na ₂ HPO ₄ 0.2%	5.0	0
5	[I] + K ₂ HPO ₄ 0.5%	5.0	1,600 u/ml
6	[I] + K ₂ HPO ₄ 0.5% + Na ₂ HPO ₄ 0.2%	5.2	0
7	糖 ブ イ ヨ ン	5.8	0
8	糖ブイヨン + CaCO ₃ 1% + MgSO ₄ · aq 0.005%	6.8	+
9	ザルコマシン用培養基 ⁽⁷⁾	5.0	+
10	ザルコマシン用培養基 + CaCO ₃ 1%	5.6	+
11	マーサン培地 ⁽⁶⁾ (炭素源 ブドウ糖)	6.9	0
12	マーサン培地 (炭素源 グリセリン)	6.8	0
13	マーサン培地 (炭素源 砂糖)	5.7	0
14	日本薬局方細菌試験用培地	5.0	0
15	麦 芽 汁	5.0	0
16	Stansly's ⁽⁵⁾ 培地	4.8	0
17	Stansly's 麦芽培地	4.8	0

小山氏培養基 A 及び培養基 [I] にては
コリスチンの生産は認められなかったの
で, 第2表にある各種培養基で培養したと
ころ, 表中に表されるように炭酸カルシウ
ム, 磷酸塩の多量添加したものにコリスチ
ンの生産が認められている. 表中 No. 15,
16, 17 は糊状化したが, これは麦芽添加
によるものと考えられる. 菌の発育も良好
でありポリミキシン⁽¹⁾の生産にも使用され
ているが, 以後検討を加えて高力価を示す
ようになって糊状化することは製造上難
点があるので, これ以上検討しないことに
した.

2. N源及びC源調整の影響 II, 1

において炭酸カルシウム及び磷酸塩の添加

によって力価を示す結果を得たが, 高単位の培養は与えないので, 培養基 [I] の N源及びC源を調整してその影響を調べてみた結果が第3表である. すなわち培養基 [I] において硫安を0%とし, N源としてペプトン, C源として粗製ブドウ糖を变量させて培養したところ, 粗ブドウ糖は零である場合と多量の場合コリスチンの生産が認められないこと, ペプトンにおいて3%以上の時はコリスチンの生産が認められないことを知った. 第3表の結果からコリスチンを生産する条件の中から粗製ブドウ糖2%を選び, これに対してペプトンを0.5%から3%の間变量させ, 炭酸カルシウムを添加した場合の影響を調べたのが第4表である. 表中に示されるようにペプトン1.6%以下の場合にはコリスチンが生産されていない. 炭酸カルシウムを添加した影響は添加しない第3

第3表 N源, C源調整による影響

ペプトン %	0.5	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
粗製ブドウ糖 %	2.0	0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
24時間 { pH	4.7	7.0	4.8	4.8	4.9	4.7	4.7	4.7	4.8	4.7	4.7	4.8	4.8	4.8	4.8
力価 u/ml	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0
48時間 { pH	4.7	7.0	6.1	6.0	5.5	4.7	4.7	4.7	4.7	5.0	4.8	5.4	5.0	5.0	5.0
力価 u/ml	0	0	1,800	3,400	2,200	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0

註) 培養基組成: 肉エキス 0.25%, ペプトン 0.5%, 硫安 0.5%, 粗製ブドウ糖 2.0%, 第一燐酸カリ 0.05%, 硫酸マグネシウム 0.05%, 硫酸鉄 0.001%, 硫酸マンガン 0.001%, 食塩 0.2%, 120°, 20 分間滅菌後 pH 6.5. この組成中ペプトン及び粗製ブドウ糖について表中の如く変量させる. 表中左端の培養基は対照である.

第4表 炭酸カルシウム添加, N源調整による培養結果

ペプトン %	0.5	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0
24時間 { pH	4.7	6.0	6.0	6.0	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
力価 u/ml	0	0	+	+	+	2,800	2,000	1,000	2,000	+	1,000	2,400
48時間 { pH	4.7	6.8	6.8	7.0	7.0	7.1	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
力価 u/ml	0	0	0	+	+	+	900	900	+	+	1,300	1,500

註) 第3表の註と同一の培養基に炭酸カルシウム 1% を添加し, その組成中の硫安を 0% とし, ペプトンについて表中の如く変量させる. 左端は対照で炭酸カルシウムは無添加である. 各培養基は滅菌 120°, 20 分間後 pH 7.2 とする.

表の実験に比べてコリスチンの生産は早い, 単位には差異がない. 菌の発育状態は第3表及び第4表の各培養基において 1~4 億個体/ml で良好とはいえない.

3. 各種N源による比較 各種細菌用培養基及び培養基 [I] においてN源及びC源を調整し, さらに炭酸カルシウム添加の影響を検討したが, 菌の発育が良好でなくかつ高単位の培養が得られなかった, 他の天然物について検討してみた.

本菌をブドウ糖寒天に 30°, 3 日間培養し寒天上に発育した菌苔約 5 mm² を培養基 [I] + CaCO₃ 1% の培養基 (以後この培養基を培養基 [II] と呼称する) に接種し 27~28° にて 24 時間培養する. この培養を下記の各種培養基に 3% 接種し 26° にて培養してコリスチンの生産について比較検討した.

N源 3%, 粗製ブドウ糖 3%, 馬鈴薯澱粉 1%, 硫安 2%, KH₂PO₄ 0.2%, NaCl 0.0075%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, CaCO₃ 0 または 1%, pH 滅菌前 6.5, 滅菌 120°, 20 分間.

培養基 [II] の培養経過は次のようである. すなわち 6 時間後 pH 6.2 となり, 9 時間後 pH 6.2 で力価を示さないが, 菌体数はかなり認められる. 24 時間後 pH 6.2 で力価 2,500 u/ml, 菌体数 2.3 億個体/ml を示した. 以後 31 時間, 36 時間後が力価, 菌体共最高 (2,900 u/ml, 3.6 億個体/ml) を示し, 48 時間, 72 時間と経過するに従い pH は上り, 力価, 菌体数は減少する傾向を示した.

N源を代えて培養し, それぞれの場合の炭酸カルシウム添加の影響を調べた結果が第5表である. 炭酸カルシウムの添加は無添加の場合に比して優り, 炭酸カルシウム添加の場合では椰子粕, コーンミール, オートミール

第5表 各N源による検討結果

N 源		24時間		30時間		48時間	
		pH	力価 u/ml	pH	力価 u/ml	pH	力価 u/ml
大豆粕	CaCO ₃ 0%	5.0	+	4.8	1,000	4.8	1,500
	" 1	5.7	3,700	5.6	6,000	6.6	4,000
椰子粕	" 0	5.0	+	4.8	1,500	4.8	2,200
	" 1	5.9	6,400	5.6	10,000	6.2	10,000
バーム粕	" 0	5.0	+	4.9	1,200	4.7	1,800
	" 1	5.7	2,500	5.6	6,800	6.2	4,800
落花生粕	" 0	5.0	+	4.8	1,000	4.8	1,600
	" 1	5.6	2,600	5.4	4,800	6.2	2,500
オートミール	" 0	5.0	+	4.8	1,400	4.8	1,800
	" 1	5.7	5,500	5.6	7,500	5.8	5,900
米	" 0	5.2	+	5.0	+	4.8	1,400
	" 1	5.8	3,500	5.6	4,500	5.6	4,500
コーンミール	" 0	5.0	+	4.8	1,500	4.7	2,600
	" 1	5.7	4,500	5.4	8,000	5.4	10,000
コンミール培養基 (CaCO ₃ 1%) 中硫安の代りに	硝安	5.4	6,000	5.4	7,000	5.4	4,100
	酒石酸アンモン	6.2	3,000	6.2	3,600	6.0	5,100
	尿素	5.4	5,600	5.4	10,000	5.4	10,500
	燐安	5.7	4,400	5.4	8,000	5.8	6,400

がコリスチンの生産に有効であることが判明した. コーンミールを用い, 炭酸カルシウム添加した培養基中の硫安の代りに硝安, 酒石酸アンモン, 尿素, 燐安について比較してみたが, 硫安, 燐安, 尿素には差は認められないが, 硝安, 酒石酸アンモンは前者に比べて劣っている.

III. 培養条件の検討 [II]

実験 II の結果からコリスチン生産にはコーンミール, 椰子粕, オートミール及び硫安, 燐安, 尿素が有効であり, 炭酸カルシウムの添加が効果があることを知った. しかし, 原料の入手の

難易, 品質の均一性及びコスト等を考慮した結果, N源として硫酸, コーンミールをとりあげ, そのものについてコリスチンを高単位に生産すべく培養条件を検討した.

コーンミール及び硫酸をN源としたいわゆる生産培養基を次のように定め, 以後培養基 [Ⅲ] と呼称する. すなわち,

コーンミール 3%, 粗製ブドウ糖 3%, 馬鈴薯澱粉 1%, 硫酸 2%, 第一燐酸カリ 0.2%, 食塩 0.0075%, 硫酸マグネシウム 0.05%, 硫酸鉄 0.001%, 炭酸カルシウム 1%, 滅菌 120°, 20 分間, pH 6.5 (滅菌前).

1. 始発 pH 培養基 [Ⅱ] 及び上記培養基 [Ⅲ] の滅菌前 pH 6.7 にすると滅菌後アルカリ性が強くなる. この状態では本菌の発育が悪く pH 7.0 になるまでに 24~48 時間要する. 最終のコリスチンの生産性については大差は認められないが培養時間が長いという難点がある. これに対して滅菌前 pH 6.5 にすると滅菌後 pH 7.2 となり, 発育状態及び培養時間の好結果を与える. 本菌はかなりアルカリ性からでも発育して長時間後にはコリスチンを生産するが, 炭酸カルシウムを添加した培養基 [Ⅱ] 及び [Ⅲ] においては培養時間の短縮という点から滅菌前 pH 6.5 が妥当である.

第 6 表 温度差別の培養結果 (1)

培養基Ⅱ	温	度	26°	28°	30°
	24時間	pH	6.4	6.2	5.8
		力価 u/ml	+	+	+
培養基Ⅲ	温	度	27°	27°	27°
	24時間	pH	5.6	5.6	5.5
		力価 u/ml	1,300	2,000	3,500
	30時間	pH	5.5	5.5	5.5
		力価 u/ml	4,500	5,500	6,200
	48時間	pH	5.5	5.6	5.5
		力価 u/ml	10,700	10,500	10,400

第 7 表 温度差別の培養結果 (2)

温 度		26°	28°	30°	
培 養 基 Ⅲ	24時間	pH	5.8	5.6	5.5
		力価 u/ml	3,000	6,200	8,000
		pH	5.6	5.5	5.4
	30時間	力価 u/ml	6,100	9,800	9,500
		pH	5.6	5.6	5.5
		力価 u/ml	10,100	10,900	8,300
	48時間	pH	5.6	5.6	5.5
		力価 u/ml	10,100	10,900	8,300
		pH	5.6	5.6	5.5

2. 培養温度 培養基 [Ⅱ] の培養温度を 26°, 28°, 30° の三通りで培養し, その各々を生産培養基, すなわち培養基 [Ⅲ] に 3% 接種し同一条件で培養する. いわゆる増殖培養基の培養温度の比較検討を行った結果が第 6 表である. すなわち培養温度が高い方が培養基 [Ⅲ] での醗酵が早い傾向を示すが, コリスチンの最終的生産には差異は認められない. 次に培養基 [Ⅱ] の培養温度を 28° にて培養基 [Ⅲ] の培養温度を 26°, 28°, 30° と三通りに変えて比較してみた結果が第 7 表である. この場合培養温度が高いと醗酵は早いコリスチンの生産は培養温度の低いものに比して劣る.

3. 植え継ぎ順序 いわゆる種培養, 増殖培養, 生産培養の植え継ぎ方式を検討するため下記 5 通りの組合せで植え継ぎ順序を検討した.

No. 1	ブドウ糖寒天培養菌苔, 約 5 mm ²	→	培養基 [Ⅱ]	→	3% 接 種	→	培養基 [Ⅲ]					
No. 2	"	約 5 mm ²	→	培養基 [Ⅰ]	→	1% 接種	→	培養基 [Ⅱ]	→	3% 接種	→	培養基 [Ⅲ]
No. 3	"	約 5 mm ²	→	培養基 [Ⅰ]	→	同 上	→	培養基 [Ⅰ]	→	同 上	→	培養基 [Ⅲ]
No. 4	"	約 5 mm ²	→	培養基 [Ⅱ]	→	同 上	→	培養基 [Ⅱ]	→	同 上	→	培養基 [Ⅲ]
No. 5	"	約 5 mm ²	→	培養基 [Ⅰ]	→	3% 接 種	→	培養基 [Ⅲ]				

培養温度はブドウ糖寒天では 30° (3 日間), 培養基 [Ⅰ] では 30°, 培養基 [Ⅱ] では 28°, 培養基 [Ⅲ] では 27° とした.

上記 5 通りの組合せで植え継ぎ培養した結果は第 8 表である. 菌の発育の悪い培養基 [Ⅰ] の培養を直接培養基 [Ⅲ] に接種して培養する場合, すなわち No. 5 の時は菌の増殖が遅いことを示している. また培養基 [Ⅰ] を 2 代培養したものを培養基 [Ⅲ] に接種して培養した場合, すなわち No. 3 の時はやはり菌の増殖が遅く, その上 No. 5 に比してもコリスチンの生産が劣るように見られる. ブドウ糖寒天より培養基 [Ⅱ] に接種し培養したものを培養基 [Ⅲ] に接種培養した場合, すなわち No. 1 及びブドウ糖寒天より培養基 [Ⅰ] に接種し培養したものを培養基 [Ⅲ] に接種培養した場合, すなわち No. 2 が他の植え継ぎ培養の組合せよりコリスチンを多く生産している. 培養基 [Ⅰ] での培養よりも菌の発育にやや優る培養基 [Ⅱ] に 2 代培養したものを培養基 [Ⅲ] に接種した場合, すなわち No. 4 の時は pH の変化は No. 1 と似ているが, コリスチンの生産は劣っている. No. 5 の場合はむしろ 72 時間以後さらにコリスチンの生産を高めるという望みがある. 培養基 [Ⅱ] に 2 代培養

第 8 表 植え継ぎ順序の検討結果

培養基	No.					
		1	2	3	4	5
I	24時間	pH	4.7	4.7		4.7
		力価 u/ml	0	0		0
I	24時間	pH	↓	4.7		↓
		力価 u/ml	↓	0		↓
II	24時間	pH	5.7	5.9	5.7	
		力価 u/ml	+	1,500	+	
II	24時間	pH	↓	↓	↓	
		力価 u/ml	↓	↓	↓	
III	24時間	pH	6.2	6.2	6.4	6.3
		力価 u/ml	4,400	+	0	0
	30時間	pH	6.0	6.2	6.3	6.0
		力価 u/ml	5,600	+	+	4,300
	35時間	pH	5.8	6.0	6.1	5.9
		力価 u/ml	7,400	6,900	+	+
	48時間	pH	5.6	6.0	6.0	5.6
		力価 u/ml	10,300	10,000	4,600	7,800
	72時間	pH	6.8	6.7	5.8	6.8
		力価 u/ml	5,500	10,500	6,000	3,500

第 9 表 植え継ぎ菌液量の検討結果 (1)

培養時間	接種量 1%		接種量 3%	
	pH	菌数	pH	菌数
15時間	6.0	卅	6.0	卅
17	6.0	卅	6.0	卅
19	6.0	卅	6.0	卅
21	5.8	卅	5.8	卅
23	5.7	卅	5.8	卅
25	5.7	卅	5.7	卅
39	6.0	卅	6.8	卅

第 10 表 植え継ぎ菌液量の検討結果 (2)

時間	接種量					
	1%	3%	5%	10%	20%	
24時間	pH	6.0	5.6	5.5	5.5	5.4
	力価 u/ml	4,400	8,000	10,000	7,100	5,650
30時間	pH	5.7	5.5	5.4	5.5	5.5
	力価 u/ml	7,950	11,000	11,700	7,750	8,850
48時間	pH	5.7	6.0	6.2	6.4	6.7
	力価 u/ml	8,000	9,500	9,300	8,000	7,300

第 11 表 植え継ぎ時期の検討結果

培養基 II	植継時間 (h)	18	20	22	24	26	28
	pH	6.0	6.0	6.0	5.8	5.8	6.0
	力価 u/ml	0	+	+	1,800	2,000	2,500
培養基 III	培養時間 (h)	24	24	24	24	24	24
	pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	力価 u/ml	1,000	7,100	7,400	7,100	7,800	9,300
	培養時間 (h)	34	32	30	28	26	
	pH	5.6	5.6	5.8	5.8	5.9	
	力価 u/ml	10,000	10,000	10,000	10,700	8,600	
	培養時間 (h)	48	46	44	42	40	38
	pH	5.8	6.0	6.0	5.5	5.8	5.6
	力価 u/ml	8,600	8,600	8,600	9,100	7,100	7,100

した No. 4 の場合は、培養基 [I] に 2 代培養した No. 3 の場合と同様にコリスチンの生産が劣っている。以上の実験結果から No. 2 の組合せが妥当な植え継ぎ順序と考える。

4. 植え継ぎ菌液量 プドウ糖寒天に 30°, 3 日間培養した菌苔, 約 5 mm² を培養基 [I] に接種し, 30°, 24 時間培養したもの培養基 [II] へ, それぞれ 1%, 3% 接種し 28° にて培養したときの pH の変化及び菌の発育状態の結果は第 9 表の通りである。菌数数の測定は Bürcker Türk の計数盤によって行った。なお表中の + は約 0.8 億個体/ml である。実験の結果 1%,

3% 接種による差は認められない。次に前記 No. 2 の植え継ぎ順序に従い, すなわちブドウ糖寒天に 30°, 3 日間培養した菌苔, 約 5 mm² を培養基 [I] に接種, 30°, 24 時間培養したものを培養基 [II] へ 1% 接種培養し, その 28°, 24 時間後の培養を培養基 [III] へそれぞれ 1%, 3%, 5%, 10%, 20% と接種し, 27° に培養した結果は第 10 表の通りである。実験の結果は接種量が増加するにつれて酸酵が早くなるが, 10% 以上の場合はコリスチンの生産が逆に劣っている。1% 接種の場合は長時間後に期待がもたれるが, 培養時間の長くなるという難点がある。従って表中の 3%,

接種培養が妥当な条件と考えられる。

5. 植え継ぎ時期 培養基 [II] においてその培養をいつ培養基 [III] へ接種したらよいかをみるために, 培養基 [II] での培養 18 時間, 20 時間, 22 時間, 24 時間, 26 時間, 28 時間のものをそれぞれ培養基 [III] に 3% 接種して比較した結果が

第 11 表である。この結果によれば 24 時間が優れているようであるが, 18 時間より 24 時間まで大差は認められない。26 時間, 28 時間は前者に比して劣る。植え継ぎ時期が遅れた時期に接種されるので, コリスチンの生産性が劣ると考えられる。

6. 酸素要求度 本菌の培養において酸素がどの程度に必

要なのか調べるため, プドウ糖寒天より培養基 [I], 次いで培養基 [II], さらに培養基 [III] へ植え継ぎ培養した際本菌の酸素に対する性質を検討した。すなわちブドウ糖寒天に培養 30°, 3 日間した菌苔, 約 5 mm² を培養基 [I] に接種 30°, 24 時間培養したものを培養基 [II] に 1% 接種 28°, 24 時間培養したものを培養基 [III] に 3% 接種し 27° で培養する。そして下記の条件付して培養し検討した。

No. 1 : 対照, 培養 [III] を通常通り振盪培養を継続する。

第 12 表 *Bacillus colistinus* の酸素要求の検討結果

		No.	1	2	3	4	5
培養 基 I	24 時間	pH	4.7				
		力価 u/ml	0				
培養 基 II	24 時間	pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
		力価 u/ml	800	+	800	800	800
培養 基 III	24 時間	pH	5.6	5.6	5.6	5.8	5.8
		力価 u/ml	7,600	6,300	7,500	+	+
	30 時間	pH	5.4	5.5	5.6	5.8	5.8
		力価 u/ml	11,450	10,000	7,900	+	+
	48 時間	pH	6.0	5.9	5.4	5.4	5.8
		力価 u/ml	10,600	8,800	8,600	4,700	+

No. 2 : 培養基 [I] で 30°, 24 時間培養した後, 静置 6 時間を経過して培養基 [II] に接種し, 培養基 [II] 及び [III] では No. 1 の場合と同様に振盪培養する。

No. 3 : 培養基 [II] まで通常通り培養したもの培養基 [III] に接種し, 振盪培養を 24 時間行った後は静置培養に切換える。

No. 4 : No. 3 の場合の培養基 [III] への培養基 [II] の培養を接種するまで同じ条件で, 培養基 [III] に接種された直後より静置培養を行い, 24 時間後振盪培養に切換える。

No. 5 : No. 4 の場合の培養基 [III] の培養を振盪培養に切換えず最初から終りまで一貫して静置培養する。

上記 No. 1~5 の培養結果が第 12 表である。培養基 [III] において静置培養に一貫した No. 5 は 48 時間までコリスチンの生産が行われず, 中途から振盪培養した No. 4 の場合 48 時間にコリスチンの生産が認められた。また 24 時間まで振盪培養して以後静置培養に切換えた No. 3 の場合 24 時間までは当然対照の No. 1 と同じであるが, 後半コリスチンの生産がのびていない。これらのことからコリスチンの生産には空気, すなわち酸素が必要であるということが判明した。また培養基 [I] から直ちに培養基 [II] に植え継ぐのではなく, 6 時間静置した場合, すなわち空気の供給を少なくした培養を植え継いだときはいかなるようすを示すかが No. 2 の結果で, 直ちに培養基 [II] に植え継いだ場合は 24 時間後 800 u/ml の力価を示すのに対し, 力価 + である。そして培養基 [III] での生産性も対照 No. 1 に比して劣る。このことはいわゆる種培養が次の培養基に植え継がれる際何かの都合で放置されると結果が悪いということを物語るものである。

III. 総 括

Bacillus colistinus Koyama を培養してコリスチンを生産するにあたり, 藤正政人氏より指示された小山氏培養基 A, B (培養基 [I]) 及び各種細菌用培養基にはコリスチンは生産されなかったので, 培養基 [I] についてその N 源及び C 源を調整したり, 炭酸カルシウム添加の影響を検討したが, 高単位のコリスチンは生産されず, かつ本菌の発育も良好でなかった。

次いで高単位にコリスチンを生産させるべく N 源として他の天然物及び炭酸カルシウム添加の影響を調べた結果, 炭酸カルシウム添加の条件のもとに, コーンミール, 椰子粕, オートミールが有効であること, そしてコーンミールを使用した際には硫酸, 燐安, 尿素は大差なく, 硝安, 酒石酸アンモンより優れていることを知った。原料として入手の難易, 品質の均一性及び経済性を考えた上コーンミール, 硫酸をとり上げることにした。これについてコリスチン生産する最適条件を検討したところ, 始発 pH は滅菌前 pH 6.5, 培養温度は培養基 [I] では 30°, 培養基 [II] では 26°, 28°, 30° に大差なく従って 28° とし, 培養基 [III] では温度が高いと酸酵は早い, コリスチンの最終生産が劣ることが認められ, 結局 26~28° が適温であることを知った。始発 pH 及び培養温度の妥当な条件の下に, 植え継ぎ方式を定めるため, 植え継ぎ順序, 接種量, 時期及び酸素要求度を検討したところ, 本菌をブドウ糖寒天に 30°, 3 日間培養し, 寒天上に発育した菌苔, 約 5 mm² を培養基 [I] に接種し, 30°, 24 時間培養したものを培養基 [II] へ 1% 接種, 28°, 22~24 時間培養したものを培養基 [III] へ 3~5% 接種, 26~28° に培養するのが妥当であること及び本菌はコリスチンを生産するためには酸素を必要とすることを知った。

本研究報告の発表を許可された万有製薬株式会社岩垂亨社長並びに会社幹部の方々に厚く感謝の意を表します。実験に協力して下さった梅田すみ子嬢, 並びに助言を戴いた岡西昌則氏に深く感謝の意を表します。

- (1) 小山康夫 : 日本特許, 昭和 25, 10230.
- (2) 小山康夫 : *J. Antibiot.*, 3(7), 457(1950).
- (3) 小田 武, 上田文雄 : 薬学, 74, 1243, 1246 (1954).
- (4) 栗原藤三郎, 鈴木謙次 : 東北薬大紀要, 1, 16(1954).
- (5) P.G. Stansly, M.E. Schlosser, N.H.

- Ananenko, M. H. Cook : *J. Bact.*, 55, 573 (1948).
- (5) 東大農学部農芸化学教室編 : 実験農芸化学, 上巻, p.191 (1960).
- (6) H. Umezawa et al. : *J. Antibiot.*, 6 A, 147, 153 (1953).