〔農化 第36巻, 第1号, p.24~28, 1962〕

Bacillus colistinus Koyama の生産する抗生物質

コリスチンについて (第2報)*

培養条件の検討 (II)

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

前報⁽¹⁾において *Bacillus colistinus* Koyama の各種培養基に対する培養状態及び N 源, C 源の調整による抗生物質コリスチンの生産性について検討したところ, 炭酸カルシウム添加が必要であり, また天然 N 源が有効であることが判明した. 次いでその培養基における始発 pH, 培養温度, 植え継ぎ順序及び接種量等の検討の結果を述べた.

本報においてはさらにコリスチンの生産性を向上させるべく種々検討を加えた. その結果を報告する. なお培養基の略称等は第1報に従った.

II. 実 験

I) 培養条件の検討

1. 生産培養基 (培養基 [III]) の成分変化: ブドウ糖寒天より培養基 [I] に, 次に培養基 [II] に, さらに培養基 [III] に植え継ぎ, 下記のような条件で培養条件で培養するとき培養基 [II] の各成分, pH, 力価及び菌体数の変化を調べた.

培養条件: ブドウ糖寒天 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] に接種する.

培養基 [I]: 30°, 24時間培養したものを培養基 [II] に 1% 接種する

培養基 [II]: 28°, 24時間培養したものを培養基 [III] に 3% 接種する

培養基 [III]: 27° にて培養する.

培養基 [III] を上記条件で培養した際, 時間の経過と共に pH, 全糖, 直接還元糖, アンモニア態窒素, 菌体数及び力価の変化について下記の方法で測定した結果が第1表である.

第1表 培養基 [III] における各成分の変化

時間 h	pH	力価	菌体数 億	直接還 元糖%	全糖 %	NH ₃ 態 窒素%
0	7.2	—	—	2.73	6.46	0.52
3	—	—	—	2.60	6.22	—
6	—	—	—	1.96	5.70	0.52
9	—	—	—	0.80	5.01	—
12	—	—	—	0.34	4.30	—
15	—	—	—	0.25	3.83	—
18	5.8	5,200	2.1	0.28	3.52	0.52
21	5.8	7,500	3.2	0.42	3.35	0.52
24	5.7	9,000	4.5	0.55	3.29	0.52
27	5.6	10,500	5.6	0.69	2.82	0.52
30	5.4	11,200	7.5	0.74	2.37	0.52
33	5.4	12,000	10.0	0.78	1.96	0.52
36	5.4	12,200	11.2	0.83	1.52	0.52
39	5.35	12,000	11.0	0.92	1.14	0.52
42	5.35	11,800	11.0	0.92	0.73	0.52
45	5.4	11,700	10.8	0.92	0.65	0.52
48	5.5	11,000	10.8	1.00	0.65	0.55

pH: 東洋濾紙 KK, pH 試験紙及びガラス電極 pH メーター. 全糖: 加水分解の方法⁽²⁾, 還元糖の定量法⁽³⁾. 直接還元糖: 還元糖の定量法⁽³⁾ (グルコースとして定量). アンモニア態窒素: 拡散分析法⁽⁴⁾. 菌体数: Bürcker Türk の計数盤. 力価: 抗生物質基準.

この結果によると菌の増殖と共に力価は上昇し, pH は低くなる. そして菌の増殖衰退と共に力価も低下し, pH はやや上昇気味となる. アンモニア態窒素は一定である. 直接還元糖は培養初期に消費され 15 時間以後は極少量ずつ定量値が増加している. 全糖は徐々に消費されている.

2. 培養基 [III] の各成分の変量による培養の検討: 1 において行った植え継ぎ方法の中, 培養基 [III] の組成中コーンミール, 粗製ブドウ糖, 馬鈴薯澱

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

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

第2表 培養基[Ⅲ]の各成分の変量による培養結果

	3%	コーンミールの変量				粗製ブドウ糖の変量			馬鈴薯澱粉の変量			硫酸の変量		
		0	1	6		3	3	3	3	3	3	3	3	3
コーンミール	3	3	3	3		0	1	6	3	3	3	3	3	3
粗製ブドウ糖	1	1	1	1		1	1	1	0	2	4	1	1	1
馬鈴薯澱粉	2	2	2	2		2	2	2	2	2	2	0	1	4
硫安	定めた量	同左	同左	同左		同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左
無機塩類	5.5	8.0	6.2	5.4		5.8	5.4	5.5	5.4	5.8	5.9	5.6	5.8	5.8
28時間 { pH	6,700	0	+	9,200		4,500	7,300	2,500	7,800	3,600	1,300	+	5,400	2,200
力価 u/ml	5.8	8.0	6.8	5.4		6.0	5.4	5.4	5.4	5.8	6.0	5.5	6.0	5.6
48時間 { pH	8,600	0	500	10,000		4,000	10,000	4,300	8,200	4,800	3,100	+	5,800	4,600
力価 u/ml														

第3表 培養基組成中のコーンミール, 粗製ブドウ糖, 硫酸の変量による培養結果

コーンミール	2%	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	6
粗製ブドウ糖	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	0
硫安	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
24時間	pH	5.7	5.5	5.5	6.0	5.7	5.4	5.4	6.2	5.8	5.4	5.4	6.2	5.8	5.4	5.4	6.2	5.8	5.4	5.4
	力価	5.0	10.3	9.3	0	2.6	6.2	9.5	+	0.5	6.6	7.3	0.8	3.4	7.3	8.8	0.8	2.2	6.5	8.4
30時間	pH	5.8	5.4	5.4	6.2	5.8	5.4	5.4	6.0	5.6	5.4	5.4	6.0	5.8	5.4	5.4	6.0	5.7	5.4	5.4
	力価	5.1	10.0	12.3	0.5	3.0	8.0	10.0	0.75	3.8	8.2	9.8	1.8	4.8	8.8	10.5	2.2	4.0	8.0	9.8
48時間	pH	5.9	6.1	6.2	8.0	6.0	6.0	5.6	8.0	5.8	5.8	5.5	7.2	6.0	5.4	5.4	6.7	6.4	5.4	5.4
	力価	5.8	11.0	13.0	+	6.3	10.0	12.0	+	7.6	12.0	13.9	0.8	3.2	12.0	14.0	3.7	6.5	11.8	14.0
コーンミール	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	
粗製ブドウ糖	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	
硫安	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
24時間	pH	5.4	5.4	5.4	8.0	5.7	5.4	5.4	8.0	5.5	5.5	5.4	8.0	5.7	5.6	5.5	8.0	5.7	5.6	5.5
	力価	6.8	18.5	14.2	0	9.0	10.5	13.9	0	8.4	10.4	12.4	0	12.0	13.5	15.8	0	4.4	10.0	8.7
30時間	pH	5.4	5.4	5.4	8.0	5.5	5.4	5.4	8.0	5.4	5.4	5.4	8.0	5.5	5.4	5.4	8.0	5.5	5.4	5.4
	力価	8.2	18.4	15.0	6.0	10.0	10.8	15.0	0	12.6	13.2	14.0	0	5.4	15.0	16.5	0	4.7	14.2	10.6
48時間	pH	5.7	5.9	5.8	8.0	6.2	5.9	5.7	8.0	5.4	5.9	5.4	8.0	5.7	5.4	5.4	8.0	5.4	5.4	5.4
	力価	5.2	12.4	13.8	0	8.0	9.0	16.8	0	8.4	16.5	16.8	0	4.6	16.4	17.9	0	7.2	13.0	14.5
コーンミール	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	
粗製ブドウ糖	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	
硫安	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
24時間	pH	5.7	5.7	5.4	8.0	5.8	5.6	5.5	7.4	5.8	5.6	5.5	7.0	5.8	5.6	5.5	6.9	5.7	5.5	5.6
	力価	6.8	14.9	13.9	0	4.2	5.4	5.3	0	2.5	5.5	10.7	0	4.2	6.4	7.6	0	5.4	6.7	7.7
30時間	pH	5.5	5.4	5.4	8.0	5.6	5.4	5.4	6.7	5.6	5.4	5.4	6.2	5.5	5.4	5.4	6.2	5.4	5.4	5.4
	力価	11.6	21.5	20.0	2.5	5.1	8.1	10.0	0	7.2	10.0	13.1	1.6	8.7	12.6	15.8	+	6.9	12.0	15.0
48時間	pH	6.0	5.7	5.2	8.0	5.9	5.4	5.4	8.1	5.5	5.5	5.2	6.4	5.5	5.5	5.4	6.8	5.6	5.4	5.4
	力価	7.2	14.2	12.8	0	5.6	9.2	14.0	+	6.0	13.0	14.2	4.6	10.8	14.2	16.9	2.5	8.6	13.0	16.8

力価 1.0=1,000 u/ml

力価 1.0=1,000 u/ml

第1図 コーンミール, 粗グルコース, 硫酸の変量による培養結果 (30 時間後の力価をプロットした)

図中の % はコーンミールを示す。

粉及び硫酸を变量させて培養した結果が第2表である。実験の結果から次のことが言える。コーンミールは増量に従って力価が上昇している。粗製ブドウ糖は1%が最高で、増量に伴ない力価が低下している。馬鈴薯澱粉は増量するに従って力価低下の傾向である。むしろ使用しない方がよい。硫酸は1%, 2%が良好で、0%, 4%と力価が低下している。

実験の結果からして馬鈴薯澱粉はコリスチンの生産には不適と認められるので、組成中より除き、下記培養基について、コーンミール、粗製ブドウ糖及び硫酸をそれぞれ变量して培養し比較検討してみた。

コーンミール 0~6%, 粗製ブドウ糖 0~4%, 硫酸 0~3%, CaCO_3 1%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NaCl 0.0075%, 滅菌, 120° , 20 分間後 pH 7.2.

培養の方法は、ブドウ糖寒天と 30° , 3 日間培養し、寒天上に発育した菌苔、約 5mm^2 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上記各種培養基 (第3表参照) に 4% 接種し 27° にて培養した結果が第3表である。この結果の30時間後の各培養基の力価を、硫酸1%, 2%, 3% を横軸にて、粗製ブドウ糖 0%, 1%, 2%, 3%, 4% の各々を区別した場合、コーンミール 0%, 2%, 4%, 6% の時いかなる力価を示すか、図示したものが第1図である。図において粗製ブドウ糖1%の場合、硫酸1%のときにコーンミール 0%, 2%, 4%, 6% と变量したとき硫酸1%のところへ、下から各々の力価をプロットした。同様に硫酸2%のときは、硫酸2%のところへ下から各々の力価をプロットした。そしてコーンミール0%の組三点 (硫酸の变量1%, 2%, 3%) を結んで曲線を描いた。

図から判るように粗製ブドウ糖0%を除いて、1, 2, 3, 4%の場合、硫酸の变量に関係なくコーンミール6%が最高で、次いで4%, 2%, 0%の順にコリスチンの生産が低下している。

粗製ブドウ糖は1~4%までコリスチンの生産性に大差を認めるわけにいかない、むしろ0%のとき硫酸2%以上、及びコーンミール4%以上の時かなり優秀な結果を与えた。

硫酸は粗製ブドウ糖0%のとき、硫酸3%及びコーンミール4~6%のとき優秀な結果を与えているが、粗製ブドウ糖1~4%の場合いづれも硫酸2%が良好で、これより少ない1%, 多い3%共コリスチンの生産が劣っている。

第2図 培養基濃度の変化と力価
比率 コーンミール:粗グルコース:硫酸

第2図は培養基濃度とコリスチンの生産との関係を示したもので、図において×点のグラフを説明すると次のようである。横軸1の×点はコーンミール2%, 粗製ブドウ糖1%, 硫酸1%の培養基の30時間後の力価であり、次の横軸2における×点は各成分濃度2倍の培養基の結果であり、横軸3の×点は3倍濃度の場合の結果である。図中曲線2:1:1はコーンミール、粗製ブドウ糖及び硫酸の比率である。○点は各比率2:0:1, △点は各比率2:2:1のグラフで、×点の場合と同じ要領である。これら3つの曲線から判るように培養基の濃度の高い方が低いものに比べてコリスチンを多く生産している。しかしながら3倍濃度以上にしても生産性は向上するであろうが、曲線の具合からみて、5倍濃度にしても卓越した高力価は得られないと予想される。むしろ高濃度は培養時間の延長が認められるので、コリスチンの生産にはコーンミール4~6%, 粗製ブドウ糖0~1%, 硫酸2%が妥当であるといえる。

3) コーングルテン及びコーンスターチの検討: 2の実験結果からコーンミールが有効であることが判ったので、コーンミールをコーングルテンとコーンスターチに分けて、そのいずれが有効か実験2と同じ要領で検討した結果が第4表である。

実験の結果から判るようにコーングルテンは有効でなく、コーンスターチはコーンミール6%のものにこれを1%添加した培養基がやや有効性を示しているが、コーンミールを減らしたコーンミール3%とそれにコーンスターチ1%を加えたものとを比較したとき、結果は大差ない故、コーンスターチを有効であると速断するわけにいかない。以上の実験結果からコーングルテン及びコーンスターチいずれがコリスチンの生産に有効であるか判

第 4 表 コーングルテン及びコーンスターチの生産性の検討結果

コーンミール	6%	0	0	0	6	3	3	3	明しなかった。むしろコーンミールをそのまま使用することがよいということである。またこの実験において、粗製ブドウ糖を 3% 加えたコーンミール 3% の場合は粗製ブドウ糖無添加のものに比して劣
粗製ブドウ糖	1	3	0	1	0	0	0	3	
硫 安	2	2	2	2	2	2	2	2	
馬鈴薯澱粉	0	1	0	0	0	0	0	0	
コーングルテン	0	3	6	6	0	0	0	0	
コーンスターチ	0	0	0	0	1	0	1	1	
24 { pH	5.5	5.6	5.5	5.5	5.7	5.7	5.7	5.7	
時間 { 力価 u/ml	9,200	3,000	4,200	3,300	8,200	8,200	7,600	2,700	
30 { pH	5.4	5.3	5.4	5.4	5.5	5.4	5.5	5.5	
時間 { 力価 u/ml	13,300	10,450	7,300	5,000	17,000	16,300	16,400	9,300	
48 { pH	5.6	6.0	5.8	5.8	5.5	6.0	5.8	5.6	
時間 { 力価 u/ml	16,700	10,200	5,300	5,200	14,700	10,800	14,100	11,200	

第 5 表 アミノ酸、プリン塩基、ビタミン、有機酸添加の影響

添 加 物	24時間		30時間		48時間	
	pH	u/ml	pH	u/ml	pH	u/ml
Aspartic acid	5.8	5,600	5.8	6,400	5.6	7,300
L-Alanine	5.8	6,500	5.8	7,600	6.0	6,700
DL- α -Amino-butyrac acid	5.8	6,500	5.7	7,800	6.1	5,200
L-Arginine	5.7	8,700	5.7	7,600	6.0	9,700
Asparagine	5.8	9,800	5.8	8,000	6.1	8,900
L-Cystine	5.7	2,000	5.5	3,600	5.4	2,400
L-Glutaminic acid	5.8	5,700	5.8	8,900	5.9	7,200
Glycine	5.7	5,800	5.7	8,800	6.0	6,300
Histamine-HCl	5.7	6,000	5.6	10,200	5.4	5,500
L-Isoleucine	5.6	4,900	5.7	8,600	6.0	6,100
L-Leucine	5.8	4,200	5.6	9,700	6.0	11,500
L-Methionine	5.7	4,500	5.4	4,900	5.8	2,900
L-Proline	5.7	5,200	5.5	7,700	6.0	12,000
L-Phenylalanine	5.7	4,800	5.5	5,750	5.8	5,000
L-Serine	5.6	4,500	5.4	6,650	5.4	9,800
L-Tryptophane	5.7	5,200	5.4	8,900	5.4	10,000
DL-Valine	5.8	5,800	5.6	2,200	5.8	3,000
Threonine	5.6	4,200	5.5	11,650	5.6	6,500
L-Lysine	5.6	6,200	5.5	9,300	5.4	12,000
Creatine	5.6	13,900	5.4	14,500	5.4	13,000
Uracil	5.7	2,000	5.5	7,600	5.4	9,000
Xanthine	5.5	6,800	5.5	12,200	5.4	11,600
Hypoxanthine	5.6	7,600	5.4	10,700	5.4	10,300
Guanine	5.7	2,300	5.5	5,700	5.4	9,500
Riboflavin	5.6	5,600	5.4	9,100	5.4	11,200
Pyridoxin	5.7	4,500	5.5	4,100	5.5	9,400
Nicotinamide	5.7	2,600	5.5	3,600	5.4	14,500
Vitamin B ₃	5.6	10,000	5.4	13,600	5.6	17,200
" C	5.6	11,600	5.4	14,300	5.5	15,650
Biotin	5.6	7,250	5.4	15,300	5.4	15,300
PABA	5.7	9,770	5.5	13,100	5.4	13,400
Acetic acid	5.7	3,000	5.4	9,200	5.4	16,100
Propionic acid	5.7	2,600	5.4	3,000	5.6	14,200
Succinic acid	5.7	4,400	5.5	4,800	5.6	12,600
Fumaric acid	5.7	2,800	5.5	3,350	6.0	7,600
Tartaric acid	5.7	4,600	5.7	4,400	5.4	9,700
Citric acid	5.7	3,600	5.5	4,500	5.6	14,400
Maleic acid	5.8	4,250	5.5	8,450	5.4	17,800
Malic acid	5.6	7,900	5.5	10,950	5.4	12,600
Ketoglutaric acid	5.6	9,300	5.4	13,200	5.4	16,400
Lactic acid	5.6	6,100	5.5	6,900	5.4	16,400
Pyruvic acid	5.6	4,000	5.4	14,100	5.4	18,800

っている。このことは粗製ブドウ糖の多量添加は望ましくないという前述の実験結果と一致している。

4. アミノ酸、有機酸、プリン塩基及びビタミン添加の影響：実験 1 と同じ条件で培養基 [Ⅲ] にアミノ酸 0.1 g、有機酸 0.1 g、プリン塩基 0.05 g、ビタミン 0.001 g を添加して、その個々の添加の影響を調べた結果が第 5 表である。

アミノ酸については、クレアチンがやや有効であるが、他は好結果を与えない。シスチン及びメチオニンは力価低下の傾向が認められる。

有機酸はアミノ酸、プリン塩基及びビタミンに比べて 30 時間後の力価は低いが、48 時間後の力価が上昇している。中でもプロピオン酸、マレイン酸、ケトグルタル酸及びピルビン酸及び酢酸は相当高単位を示していることは興味あることである。プリン塩基の添加は好結果を与えない。

ビタミンの添加においてはビタミン B₃、ビオチン、ビタミン C 及び PABA (*p*-aminobenzoic acid) がやや良好であるが、高単位を示すものは認められなかった。

III. 総 括

生産用培養基 (培養基 [Ⅲ]) の成分の変化及び pH、菌体数、力価等の変化について検討したところ、菌の増殖に伴い力価は上昇し、pH も低くなる。そして菌の増殖衰退と共に力価は低下し、pH はやや上昇気味となる。アンモニア態窒素は一定であり、直接還元糖は培養初期に消費され、15 時間以後少量ずつ定量値が増えている。全糖は徐々に消費されていくことが知れた。

培養基 [Ⅲ] の組成中コーンミール、馬

鈴薯澱粉, 粗製ブドウ糖及び硫酸について, それぞれの増減がどのような影響を与えるかについては馬鈴薯澱粉はむしろ否定的であった。次いで培養基組成中より馬鈴薯澱粉を除き, コーンミール, 粗製ブドウ糖及び硫酸の組合せを種々変えて検討した結果, コーンミールは 4% 以上, 粗製ブドウ糖は 0~1%, 硫酸は 2% が妥当な組成率であることを知った。コーンミールをコーングルテンとコーンスターチに分けて検討したが, そのいずれが有効であるかという結論は得られなかった。むしろコーンミールとして使用する方がよいことを知った。またコーンミールはコリスチン生産に有効であるが, 増量は培養時間を長くさせるので 6% までが妥当と考えられる。

ブドウ糖は培養基 [Ⅲ] の成分変化の結果から判るように培養初期に利用され確かに菌の発育にあずかっているが, その多量の使用はブドウ糖に由来する代謝産物がコリスチンの生産を阻害するか, 代謝系全体的問題かいずれにしてもコリスチン生産に不利な条件を与える。しかし少量の使用は必要である。

アミノ酸の添加の影響についてはクレアチンに有効性が認められるが, 他はコリスチン生産に好影響を与えるものがなく, シスチン及びメチオニンは否定的であった。プリン塩基の添加は好影響を与えない。ビタミン中ビタミン B₈, ビオチン, ビタミン C 及び PABA の添加がやや有効である。有機酸の添加についてであるが, 無添加のものに比してコリスチンの生産が遅い傾向を示した。そして酢酸, プロピオン酸, マレイン酸, ケトグルタル酸及びビルビン酸はかなり高力価の培養を与えることは興味あることである。有機酸の添加によって培養時間の長引きという欠点はあるが, いわゆるプロス, アウトの時期の幅を広げるという点からは少量の添加は有効である。

第 1 報及び本報の実験結果から *Bacillus colistinus* Koyama を培養してコリスチンを生産する振盪培養条件は次のように結論される。すなわち, *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 を培養基 [Ⅰ] に接種し, 30°, 24 時間培養したものを培養基 [Ⅱ] に 1% 接種し, 28°, 22~24 時間培養したものを下記培養基に 3~5% 接種し 27° に培養するとき, 35~40 時間後に最高の力価を示す培養を得る。

コーンミール 4~6%, 粗製ブドウ糖 0~1%, 硫酸 2%, CaCO₃ 1%, KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, NaCl 0.0075%, 酢酸 0~0.01%, 120°, 20 分間滅菌後 pH 7.2.

なお本菌の保存にはサンドカルチャーが有効で 1 年半経過しているが生存は確かであり, ブドウ糖寒天培養 1 代のものでコリスチンを生産する。

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) 森戸敏明: 本誌, 36, 8 (1962).

(2) 東大農学部農芸化学教室編: 実験農芸化学, 上巻, p. 131 (1960).

(3) 山田正一: 醸造分析法, p. 112 (昭和 29).

(4) E. D. Ward, J. Conway (石坂音治訳): 微量拡散分散法及び誤差論, p. 75, 82 (昭和 27).