



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Studies on Efficient Tylosin Production from Actinomyces Using Vegetable oil as the Sole Carbon Source

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 崔, 斗福 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2478">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2478</a>

氏 名 (国籍)	崔 斗 福 (大韓民国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 1 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 0 年 9 月 1 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Efficient Tylosin Production from Actinomyces Using Vegetable Oil as the Sole Carbon Source
審 査 委 員	主査 静岡大学教授 岡部 満 康 副査 信州大学教授 細野 明 義 副査 岐阜大学教授 河合 啓 一 副査 静岡大学助教授 朴 龍 洙

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

タイロシンは、16員環のラクトンに3つの糖鎖が結合したマクロライド系抗生物質である。リボソームの50Sに結合してタンパク質合成を阻害するので特にグラム陰性、グラム陽性菌、マイクロプラズマに抗菌活性を示す。現在、家畜のマイコプラズマ感染症に対して多く用いられている。このような抗生物質の生産について、生産性や収率の向上は、常に要求されている課題である。

そこで、本研究ではタイロシン生産性の向上のため、植物油に注目し、種々の植物油の検討を行った。また、植物油がタイロシン生産に有効な理由を生化学的に解明するとともに、本培養系において培養液の高粘性を示す原因を調べ、低粘性培養方法を提案した。

タイロシン生産菌である *Streptomyces fradiae* T1558 を用い、種々の植物油を調べたところ、菜種油を用いた場合、最も高いタイロシンの生産性を示した。通常グルコースやデンプンを用いた場合、それぞれ 1 g/L と 4.4 g/L のタイロシンを生産するが、菜種油の場合、7.0 g/L のタイロシンを得ることができた。更に菜種油を用いた培養における攪拌速度を最適条件である 400 rpm に決定した。

タイロシンの代謝経路には、タイロシンの前駆体、protylonolide 生合成酵素である methylmalonyl-CoA carboxyltransferase (EC 2. 1. 3. 1) の活性が律速になりやすい。菜種油の場合、methylmalonyl-CoA carboxyltransferase (EC 2. 1. 3. 1) の活性は、可溶性デンプンやグルコースを炭素源とした場合に比べ、2～4倍高い値であった。ま

た菜種油を用いた場合、タイロシンの前駆体を構成する細胞内プロピオン酸濃度が高いことが明らかとなった。例えば、グルコースを用いた場合、タイロシンの前駆体を構成する細胞内プロピオン酸濃度は非常に低くなった。そこで、培養3日目に 0.2 g/L のプロピオン酸を添加したところタイロシン濃度が 1 から 3.8g/L まで増加した。この結果は、菜種油の場合、可溶性デンプンやグルコースを炭素源とした場合に比べ、protylonolide 生合成酵素の活性と細胞内プロピオン酸濃度が高いので、タイロシンの前駆体、protylonolide 生合成反応が律速にはならなかったことを示した。

*S. fradiae* の培養における粘度の増加は、培養液の不完全混合を招き、リアクターの酸素移動を低下させ、タイロシン生産性を低下させる。本研究では、粘性の増加は主に菌糸形態によるものであることを確認した。菌糸形態は、用いた窒素源によって変化した。たとえば、gluten meal を用いた場合、菌糸形態はフィラメント呈し、高粘性を示したが、pharmamedia を用いた場合はペレット状となり、その結果として低粘性を示した。従って、それぞれの窒素源の最適配合（gluten meal : pharmamedia=10 : 10）を決定して培養したところ、粘度が通常の 1/3 程度まで下がり、通常培養が不可能なエアリフトバイオリアクターにおいても 7.4 g/L のタイロシンを得ることができた。これは、菌糸形態をペレット化することによって培養液の粘度を下げ、結果的に溶存酸素濃度を高く維持することが出来たのでタイロシンの生産性が向上したと考えられる。

以上の研究により、高粘性のタイロシン培養において炭素源として菜種油を用い、タイロシンの高収率生産の可能性を実証することが出来た。本研究の結果は、実際の抗生物質発酵生産において非常に有効な結果であり、多様な応用が可能であることを示唆している。

## 審 査 結 果 の 要 旨

平成10年8月7日13時より静岡大学農学部において審査委員全員出席のもとで公開学位論文発表会を行った。審査委員、大学院生、学部学生など含め約30名程であった。約40分の学位論文発表の後、30分の学位論文に関する質疑応答が行われた。

その内容を要約すると、タイロシン生産性の向上のため、植物油に注目し、種々の植物油の検討を行い、植物油がタイロシン生産に有効な理由を生化学的に解明するとともに、本培養系において培養液の高粘性を示す原因を調べ、低粘性培養方法を提案した研究である。

タイロシン生産菌である *Streptomyces fradiae* T1558 を用い、種々の植物油を調べたところ、菜種油を用いた場合、通常グルコースやデンプンを用いた場合に比べて、それぞれ7倍と1.6倍のタイロシンのタイロシンを得ることができた。

この理由についてタイロシンの代謝経路を検討したところ、タイロシンの前駆体、protylonolide生合成酵素である methylmalonyl-CoA carboxyltransferase (EC 2.1.3.1) が重要な働きをしていることが分かった。菜種油の場合、この活性は、可溶性デンプンやグルコースを炭素源とした場合に比べ、2~4倍高い値であっ

た。この結果は、菜種油の場合、可溶性デンプンやグルコースを炭素源とした場合に比べ、protylonolide生合成酵素の活性が高いので、タイロシン生合成反応が順調に進むことを示した。

*S. fradiae*の培養における粘度の増加は、培養液の不完全混合を招き、リアクターの酸素移動を低下させ、タイロシン生産性を低下させる。本研究では、粘性を増加は主に菌糸形態によるものであることを確認した。菌糸形態は、用いた窒素源 gluten meal、pharmamediaによってフィラメント化或いはペレット化の傾向であった。従って、それぞれの低粘性でかつ高生産性を示す窒素源の最適配合を決定して培養したところ、粘度が通常の1/3程度まで下がり、通常培養が不可能なエアリフトバイオリアクターにおいても通気攪拌槽と同程度の生産性を得ることができた。

以上の研究により、高粘性のタイロシン培養において炭素源として菜種油を用い、タイロシンの高収率生産の可能性を実証することが出来た。本研究の結果は、実際の抗生物質発酵生産において非常に有効な結果であり、多様な応用が可能であると示唆している。

公開論文発表後、審査委員による合格判定のための討議を行った。多少意見の相違はあったが、発表態度は良好であり、研究結果に対する理解も十分なものであった。また、質問に対する応答もおおむね明確であった。学位論文の内容及び論文発表を総合し、審査員全員が一致して「合格」と判定した。

以上によって、審査委員全員一致して本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

なお、本論文は、以下に示す課題で国際雑誌に掲載済または掲載予定である。

#### 「基礎となる学術論文」

- 1) Du Bok Choi, Sinji Tamura, Yongsoo Park, Mitsuyasu Okabe, Yoshihiro Seriu, Susumu Takeda: "Efficient tylosin production from *Streptomyces fradiae* using rapeseed oil", J. Ferment. Bioeng. 82, 183-186 (1996).
- 2) Du Bok Choi, Yongsoo Park, and Mitsuyasu Okabe: "Effect of rapeseed oil on activity of methylmalonyl-CoA carboxyltransferase in culture of *Streptomyces fradiae*" Bioscience, Biotechnol. Biochem. 62, 902-906, (1998).
- 3) Du Bok Choi, Yongsoo Park, and Mitsuyasu Okabe: "Improvement of tylosin production from *Streptomyces fradiae* culture by decrease in apparant viscosity in an air-lift bioreactor" J. Ferment. Bioeng., in press, (1998).