



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

AD optimization of  $\epsilon$ -Polylysine Production by  
Streptomyces albulus Strain

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: PRIHARDI, KAHAR メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2616">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2616</a>

氏名(本国籍)	PRIHARDI KAHAR (インドネシア共和国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第 275 号
学位授与年月日	平成 14 年 3 月 13 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	An Optimization of $\epsilon$ -Polylysine Production by <i>Streptomyces albulus</i> Strain ( <i>Streptomyces albulus</i> 株による $\epsilon$ -ポリリジン生 産の最適化)
審査委員会	主査 静岡大学 教授 岡部 満 康 副査 静岡大学 教授 朴 龍 洙 副査 岐阜大学 教授 河合 啓 一 副査 信州大学 教授 柴井 博四郎

### 論文の内容の要旨

$\epsilon$ -poly-L-lysine (以下  $\epsilon$ -PL) は、アルカロイド生産菌の検索の過程で、*Streptomyces albulus* の生産する L-lysine のホモポリマー ( $n=25-30$ ) として酒井らにより初めて見出された。 $\epsilon$ -PL は必須アミノ酸であるリジンのホモポリマーであるので安全性が高くかつカチオン含量が高いため、さらにトイレタリー用品、食品添加物、化粧品、医薬品、農薬品、電子材料などの広範な用途が期待され、 $\epsilon$ -PL の工業生産プロセスが重要になってくる。我々は、培養中の pH やグルコースの残存濃度などの培養条件を検討し、 $\epsilon$ -PL の高収率生産プロセスを構築することを試みた。さらに、低コスト化に向けた高純度な  $\epsilon$ -PL 生産システムの構築を実現するためにエアリフト型バイオリクターでの発酵生産を検討した。

本研究に用いた菌株はチツソ(株)横浜研究所から分譲を受けた  $\epsilon$ -PL 高生産株 *Streptomyces albulus* No. 410 である。本菌株はフラスコ培養では培養液中に約 1.2g/l の  $\epsilon$ -PL を生産した。培養条件が制御できる通気攪拌型ジャーフェメンターを用いて培養 pH を検討したところ、4.0-4.2 の間に維持することにより約 5g/l の  $\epsilon$ -PL (フリー体として) を生産することができた。次に流加培養による  $\epsilon$ -PL の生産を試み、培養中の pH を 4.0-4.2 の間に維持しながらグルコースの残存濃度を約 10g/l 付近に維持すると  $\epsilon$ -PL の蓄積が約 30g/l (初発液量補正済み) に増量した。ここでは  $\epsilon$ -PL の対糖収率が約 14% であった。以上の検討により、次に我々は菌体の増殖と  $\epsilon$ -PL の生産過程との関係に基づく pH 制御モデルを計画し導入した。その結果、48.3g/l の  $\epsilon$ -PL の蓄積が確認された。その対糖収率は約 18% であったが、蓄積量が非常に高いので大量に  $\epsilon$ -PL を生産するには適していると考え

た。

$\epsilon$ -PL 生産では菌体が大量に増殖し、さらに菌体が菌糸状で存在するため、粘度が高くなり、最終的に溶存酸素濃度が低くなった。通気状態を保つために攪拌数と通気量をあげるが、その場合は面菌体に対する物理的なダメージや最終生産物に対する影響などの問題がある。実際に 48.3 g/l の  $\epsilon$ -PL を生産するために非常に高い攪拌所要動力、700rpm を必要とした。動力学的な解析を行い、最大攪拌数は 700rpm から 400-500rpm に少なくすることができたが、全体的な攪拌所要動力はまだ高い。700rpm の場合では約 8 kW/m<sup>3</sup> のエネルギー供給量が必要である。この値では工業化は不可能であろうと考えた。剪断応力の少ない、またエネルギー供給量の非常に小さい(エアリフト型バイオリクター) ABR を用いた  $\epsilon$ -PL の発酵生産が未だに報告されていない。そこで 5l ジャーファメンターでの  $\epsilon$ -PL 生産と 5l ABR での  $\epsilon$ -PL 生産を比較した。その結果、5l ジャーファメンターの生産量とほぼ同量の  $\epsilon$ -PL を ABR でも生産することが可能でわかった。さらに、流加培養を行ったところでも同様な結果が得られた。その値は約 30g/l であった。ABR を用いたときの  $\epsilon$ -PL 生産には通気量 2.5vvm で約 0.35 kW/m<sup>3</sup> のエネルギー供給量が必要とした。また最終培養液中の核酸漏出量を分析したところ、ABR から採集した培養液中の核酸漏出量がジャーファメンターの結果に比べて約 2 倍少なかった。従って、ABR を用いることにより同じ生産量でも非常に少ないエネルギーでかつ高純度の  $\epsilon$ -PL の生産が可能と我々の研究でわかった。

## 審 査 結 果 の 要 旨

$\epsilon$ -poly-L-lysine (以下  $\epsilon$ -PL) は、アルカロイド生産菌の検索の過程で、*Streptomyces albulus* の生産する L-lysine のホモポリマー ( $n=25\sim30$ ) として酒井らにより初めて見出された。 $\epsilon$ -PL は必須アミノ酸であるリジンのホモポリマーであるので安全性が高くかつカチオン含量が高いので、さらにトイレタリー用品、食品添加物、化粧品、医薬品、農薬品、電子材料などの広範な用途が期待され、 $\epsilon$ -PL の工業生産プロセスが重要になってくる。申請者はこうした背景に立ち、 $\epsilon$ -PL の高収率生産プロセスの構築を試みた。

本研究に用いた菌株はチッソ (株) 横浜研究所から分譲された  $\epsilon$ -PL 高生産株 *Streptomyces albulus* No. 410 である。本菌株はフラスコ培養では約 1.2 g/l の  $\epsilon$ -PL を生産した。培養条件が制御できる通気攪拌型ジャーファメンターを用いて培養中の pH を検討したところ、4.0~4.2 の間に維持することにより約 5 g/l の  $\epsilon$ -PL (フリー体として) を生産した。次に流加培養による  $\epsilon$ -PL の生産を試み、培養中の pH を 4.0~4.2 の間に維持しながらグルコースの残存濃度を約 10 g/l 付近に維持すると  $\epsilon$ -PL の蓄積が約 30 g/l (初発液量補正済み) に収量が増大することを明らかにした。ここでは  $\epsilon$ -PL の対糖収率が約 14%であった。以上の検討により、次に申請者は菌体の増殖と  $\epsilon$ -PL の生産過程との関係に基づく pH 制御モデルを計画し導入した。その結果、48.3 g/l の  $\epsilon$ -PL の蓄積が確認された。その対糖収率は約 18%であったが、蓄積量が非常に高いので大量に  $\epsilon$ -PL を生産するには適していると考えた。

$\epsilon$ -PL 生産では菌体が大量に増殖し、さらに菌体が菌糸状で存在するため、粘度が高く

なり、最終的に溶存酸素濃度が低くなった。一般に酸素を供給するために通気攪拌を行なうが、この場合攪拌による剪断応力による菌体に対する物理的なダメージがあり、生産物収量に対する影響が考えられる。実際に 48.3 g/l の  $\epsilon$ -PL を生産するために非常に高い攪拌動力、700 rpm を必要とした。動力学的な解析を行い、最大攪拌数は 700 rpm から 500 rpm に少なくすることができたが、全体的な攪拌所要動力はまだ高い。700 rpm の場合では約 8 kW/m<sup>3</sup> のエネルギー供給量が必要である。この値では工業化は不可能であろうと考えた。剪断応力の少ない、またエネルギー供給量の非常に小さい（エアリフト型バイオリアクター）ABR での  $\epsilon$ -PL の発酵生産がまだ報告されていない。そこで 5 l ジャーファメンターでの  $\epsilon$ -PL 生産と 5 l ABR での  $\epsilon$ -PL 生産を比較した。その結果、5 l ジャーファメンターの生産量とほぼ同量の  $\epsilon$ -PL を ABR でも生産することが可能であった。さらに、流加培養を行ったところでも同様な結果が得られた。その値は約 30 g/l であった。ABR を用いたときの  $\epsilon$ -PL 生産には通気量 2.5 vvm で約 0.35 kW/m<sup>3</sup> のエネルギー供給量が必要とした。

その結果、5 l ジャーファメンターの生産量とほぼ同量の  $\epsilon$ -PL を ABR でも生産することが可能であった。さらに、流加培養を行ったところでも同様な結果が得られた。その値は約 30 g/l であった。ABR を用いたときの  $\epsilon$ -PL 生産には通気量 2.5 vvm で約 0.35 kW/m<sup>3</sup> のエネルギー供給量が必要とした。また最終培養液中の核酸漏出量を分析したところ、ABR から採集した培養液中の核酸漏出量がジャーファメンターの結果に比べて約 2 倍少なかった。従って、ABR を用いることにより同じ生産量でも非常に少ないエネルギーでかつ高純度の  $\epsilon$ -PL の生産が可能であった。

また最終培養液中の核酸漏出量を分析したところ、ABR から採集した培養液中の核酸漏出量がジャーファメンターの結果に比べて約 2 倍少なかった。従って、ABR を用いることにより同じ生産量でも非常に少ないエネルギーでかつ高純度の  $\epsilon$ -PL の生産が可能であることを明らかにしている。

本論文において明らかとされた実験ならびにシミュレーション結果は  $\epsilon$ -PL のみならず微生物による生体高分子物質の高収量生産プロセスの構築に対し有効な情報を提供するものであり、実用性においても十分価値あるものである。

よって、審査委員は全員一致で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。

学術論文の基礎となる学術論文

1. PRIHARDI KAHAR, TOSHIHARU IWATA, JUN HIRAKI, ENOCH Y. PARK, AND MITSUYASU OKABE: Enhancement of  $\epsilon$ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 91(2), 190-194 (2001).
2. PRIHARDI KAHAR, KENGO KOBAYASHI, TOSHIHARU IWATA, JUN HIRAKI, MAMI KOJIMA, AND MITSUYASU OKABE: Production of  $\epsilon$ -polylysine in an airlift bioreactor (ABR). JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 92(3), in press (2002).

既発表学術論文

1. SHIRU JIA, MINGXIA WANG, PRIHARDI KAHAR, YONGSOO PARK, AND MITSUYASU OKABE: Enhancement of yeast fermentation by addition of oxygen vectors in air-lift bioreactor. JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, 84(2), 176-178 (1997).
2. ENOCH Y. PARK, MITSURU ICHIDA, PRIHARDI KAHAR, AND MITSUYASU OKABE: Kinetics of Soybean Oil Consumption and Chephamycin C Production in Culture of *Streptomyces* sp. Using Mineral Support. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 87(3), 390-393 (1999).
3. SHIRU JIA, GUIBIN CHEN, PRIHARDI KAHAR, DU BOK CHOI, AND MITSUYASU OKABE: Effect of Soybean Oil on Oxygen Transfer in the Production of Tetracycline with an Airlift Bioreactor. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 87(6), 825-827 (1999).
4. GUOWEI HUANG, MITSUYASU OKABE, PRIHARDI KAHAR, HIROSHI TSUNEKAWA, AND YONGSOO PARK: Optimization of Tylosin Feeding Rate Profile in Production of Acetyl-Isovaleryl Tylosin (AIV) from Tylosin by *Streptomyces thermotolerans* YN554. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 91(5), 504-508 (2001).