

シンポジウム (培養プロセス工学)

215 ストレプトマイシン生成における菌体増殖および基質代謝の制御

(広島大・工) 〇井上俊三, 西澤義矩, 永井史郎

1. 目的 近年, 微生物の特異的機能の利用による有用物質生産が注目されているが, 特に最近では, 微生物に新しい機能を付与し(分子育種), 本来高等生物だけが産生するホルモン等の生理活性物質を生産する試みがなされている。これらの物質の代謝は, 微生物の生命の保持に必ずしも必要でない点で, 二次代謝として分類できよう。

本研究は, 二次代謝産物の生成機構を培養工学的立場から解明すべく, グルコース・硫酸系最小培地における *Streptomyces griseus* によるストレプトマイシン生成をとり上げ, ストレプトマイシン生成に及ぼす菌体増殖並びに炭素源, リン源, 窒素源の代謝の影響を, 細胞生理の変化を考慮して解析することを目的とした。

2. 実験方法 使用菌株は *Streptomyces griseus* HUT6037 株(広島大・工・能美研究室保存), 培地は純水 1 l 当り, グルコース 12 g, K_2SO_4 6 g, KH_2PO_4 0.4 g, NaCl 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.04 g を用い, 窒素源の $(NH_4)_2SO_4$ は 2 から 5 g/l の範囲で変えた。培養は, 小型培養槽(丸菱 MD250 及び MD500)を用い, 液量 1.5 l 及び 7 l, 攪拌速度 500 及び 350 rpm, 通気量 1 vvm, 温度 28 °C, pH 6.5 の条件で回分培養を行なった。

3. 実験結果 *S. griseus* HUT6037 株は, リン酸制限下高アンモニア濃度で培養すると図1に示すように増殖停止後のストレプトマイシン生成が著しく促進された。¹⁾ すなわち, 初発硫酸濃度 2 g/l では増殖停止後ほとんどストレプトマイシン生成がないのに対し, 硫酸 5 g/l ではストレプトマイシン生成が著しかった。これは, 中間代謝物としてのグルタミン酸の挙動¹⁾, グルタミン酸の代謝に関連する酵素の挙動²⁾ から, 高アンモニア濃度によりグルタミン酸の生成が促進され, その結果ストレプトマイシンの前駆体の一つであるグルコサミン-6-リン酸の供給が増大されたことによるものと示唆された。また, 硫酸 5 g/l の培養中の菌体から休止菌体を調製し, 各培養時間におけるストレプトマイシン産生能を γ -グルコサミンを用いる新見らの方法³⁾ で測定した結果, 増殖停止後の生産期に著しく上昇することがわかった。以上のことから, *S. griseus* によるストレプトマイシン生成は, グルコ

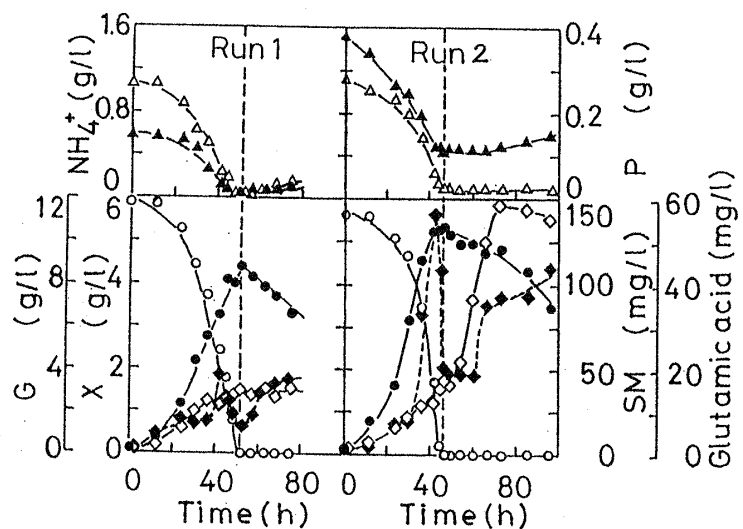


図1. グルコース・硫酸系最小培地による *S. griseus* の回分培養経過。硫酸濃度: Run 1, 2 g/l; Run 2, 5 g/l。
○: グルコース, ●: 菌体, △: リン酸イオン(P), ▲: アンモニア, ◇: ストレプトマイシン(SM), ◆: グルタミン酸

ース, アンモニアおよびリン酸の代謝が図2に示す過程を経て行なわれると仮定し, 以下に示す動力学モデルによる解析を試みた。

4. 動力学モデル 菌体増殖, 基質消費及びストレプトマイシン生成を(1)~(7)式で仮定する。ここで, *S. griseus* によるストレプトマイシン生成はグルコースあるいは窒素源の供給が不足すると著しく低下するので, 細胞の生理状態をストレプトマイシン産生活性を有するものと産生活性を失ったものに分けられるとした。また, 培養中グルタミン酸, グルタミン等の中間代謝物の細胞内濃度はそれほど大きくは変動しなかったので, ストレプトマイシン生成は主に関連する酵素の活性調節によってなされるとした。

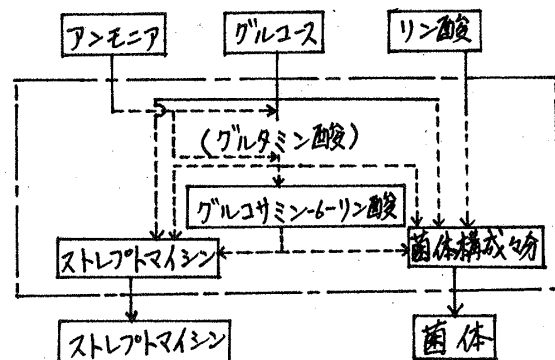


図2. ストレプトマイシン生成におけるグルコース, アンモニアおよびリン酸の代謝。

$$X = X_a + X_i \quad (1) \quad \frac{dX_a}{dt} = (\mu - k_{di} - k_{el}) X_a \quad (2)$$

$$\frac{dX_i}{dt} = k_{di} X_a \quad (3) \quad -\frac{dG}{dt} = (\mu/Y_G + m) X_a + \sum \frac{1}{Y_{G_i}} \left(\frac{dP_i}{dt} \right) \quad (4)$$

$$-\frac{dP_h}{dt} = (\mu/Y_{Ph} - k_{el,Ph}) X_a \quad (5) \quad -\frac{dN}{dt} = (\mu/Y_N - k_{el,N}) X_a + \sum \frac{1}{Y_{N_i}} \left(\frac{dP_i}{dt} \right) \quad (6)$$

$$\frac{dSM}{dt} = \alpha_{glw} (V_{glw} - \delta \cdot \mu) X_a \quad (7)$$

このモデルでは多数の未知定数が含まれることから, 現在計算機によりこれらの定数を決定し, ストレプトマイシン生成に対する最適培養条件を決定すべく検討中である。

5. 使用記号 X : 全菌体濃度, X_a : ストレプトマイシン産生活性を有する菌体の濃度, X_i : 不活性化菌体の濃度, G, N, P_h, P_i : 培養液中のグルコース, アンモニア, リン酸イオン, 生産物の濃度, SM : ストレプトマイシンの濃度, μ : 比増殖速度, k_{di} : ストレプトマイシン産生菌体の不活性化係数, k_{el} : 溶菌速度係数, m : 維持定数, $k_{el,N}$: 溶菌によるアンモニアの放出係数, $k_{el,Ph}$: 溶菌によるリン酸イオンの放出係数, α_{glw} : グルコサミン-6-リン酸からストレプトマイシンへの変換係数, δ : 菌体増殖へ使われるグルコサミン-6-リン酸量, V_{glw} : 菌体内グルコサミン-6-リン酸合成速度, $Y_{G,N,Ph}$: グルコース, アンモニア, リン酸イオンに対する増殖収率, Y_{G_i,N_i} : グルコース, アンモニアに対する生産物 (P_i) の収率。

1) 井上ら, 日本農芸化学会昭和56年度大会講演要旨集, p520。

2) T. Ngamsornpornponら, 昭和56年度日本醗酵工学会大会講演要旨集, p215。

3) Q. Nimi, A. Kokan, K. Manabe, R. Nowi: J. Ferment. Technol., 54, 587(1976)。