

**1A10-2 代謝シミュレータ WinBEST-KIT の感度解析モジュールの開発**

○厨 祐喜<sup>1</sup>, 進藤 秀彰<sup>1</sup>, 園元 謙二<sup>1,2</sup>, 白石 文秀<sup>2</sup>,  
岡本 正宏<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>九大・バイオアーク, <sup>3</sup>九大院・シス生)

微生物による物質生産プロセス改善のために、代謝工学では、様々な測定データを利用して物質生産時の代謝流束解析が行われている。そして、物質生産におけるボトルネック経路を明らかにし、遺伝子操作によってボトルネック経路を増強することで、物質生産速度・量の拡大をねらっている。しかし、これまでの代謝流束解析法では、擬定常状態を仮定しており、時間的な変化を考慮した動的な解析を行うことができない。そのため時間的な変化を考慮した動的代謝流束解析手法が必要とされている。

本研究では、代謝系の動的解析および、それによる代謝ボトルネック候補の提示のために、独自に開発してきた代謝反応系統合シミュレータ WinBEST-KIT の感度解析モジュールを開発し、動的代謝流束解析手法に組み入れることを目的とする。

静的感度解析では、各キネティックパラメータを%変化させ、新しい定常状態下で、目的とする代謝産物の生産量や各反応の流量が何%変化したかを調べる。一方、動的感度解析では、代謝系のシミュレーションを行うと同時に数値微分により感度の時間変化式を導出し、感度（%変化）を計算する。

開発した静的、動的感度解析モジュールの有効性を調べるために、アセトン・ブタノール・エタノール発酵モデルに適用して解析を行った。

**Development of sensitivity analysis module in metabolic simulator WinBEST-KIT**

○Yuuki KURIYA<sup>1</sup>, Hideaki SHINTO<sup>1</sup>, Kenji SONOMOTO<sup>1,2</sup>,  
Fumihide SHIRAIISHI<sup>2</sup>, Masahiro OKAMOTO<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Bio-Arch.,  
Kyushu Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Systems Life Sci., Kyushu Univ.)

**Key words** metabolic flux analysis, WinBEST-KIT, sensitivity analysis, dynamic metabolic flux analysis

**1A10-4 Effect of *cra* gene knockout together with *edd* and *iclR* gene knock out on the metabolism of *Escherichia coli***

○Dayanidhi Sarkar, Kazuyuki Shimizu  
(Kyushu Inst. Tech.)

[Objective] The genes activated by *cra* are known to be *aceBAK*, *icdA*, *pckA*, *ppsA* etc. and the repressed genes are *pfkA*, *pykF*, *adhE*, *nirBDC-cysG*, *fruBKA*, *ptsHI-crr*, *edd-eda* etc. In *cra* mutant, glycolytic, pentose phosphate (PP) and ED pathway were up regulated as compared with the parent strain. We then constructed *cra.edd* double mutant to block ED pathway. While glycolytic pathway was more activated, the TCA cycle was repressed. In the present study, we constructed *cra.edd.iclR* triple mutant to activate the glyoxylate pathway and investigated the metabolism of this triple mutant based on the gene expressions and enzyme activities.

[Methods and Results] The strains used are the wild type *E.coli* BW25113 (lacIq rrnBT14 DlacZwJ16 hsdR514DaraBADLD78) and its *cra* gene knockout mutant JW0078, *cra.edd* double mutant and *cra.edd.iclR* triple mutant. Aerobic batch and chemostat cultivations were conducted using M9 medium. In *cra* mutant, it was shown that glycolysis, oxidative PP pathway and ED pathway were up-regulated. The *cra.edd* double mutant exhibited enhanced glycolysis pathway and repressed TCA cycle, resulting in the overproduction of acetate. The *cra.edd.iclR* triple mutant produced less acetate, resulting in higher biomass yield than *cra*, *cra.edd* and the parent strain.

**Effect of *cra* gene knockout together with *edd* and *iclR* gene knock out on the metabolism of *Escherichia coli***

○Dayanidhi Sarkar, Kazuyuki Shimizu  
(Kyushu Inst. Tech.)

**Key words** *Escherichia coli*, *cra* mutant, gene expression

**1A10-3 Effect of nicotinic acid on the metabolism in *arcB* gene knockout *Escherichia coli* for NADH oxidation.**

○Syed Nizam, Kazuyuki Shimizu  
(Kyushu Inst. Tech.)

[Objective] ArcA/B system is mainly responsible for the regulation of many gene expressions responding to the availability of oxygen and other electron acceptor in the culture environment. *arcB* gene mediates the *arcA* gene expressions by phosphorylating it and repress the TCA cycle, where *gltA*, *icdA*, *lpd*, *sucABCD*, *sdhCDAB*, *fumAC*, *mdh*, *aceBAK*, *aceEF* genes are known to be repressed by *arcA/B*. In the present study, therefore, investigated the effect of reoxidizing NADH on the metabolism by adding nicotinic acid based on the measurement of gene expression, and enzyme activities.

[Methods and Results] The strains used are the parent strain *E.coli* BW25113, and *arcB* mutant (JW 3177). Glucose was used as a carbon source. The enzyme activities of the TCA cycle and pentose phosphate pathway of *arcB* mutant showed significant up regulation, which implies the activation of TCA cycle but the result indicates the feedback inhibition due to the accumulation of NADH. Upon addition of nicotinic acid, the TCA cycle enzymes were found more up regulated. Under chemostat cultivation, the TCA cycle enzymes and genes were found more up regulated as nicotinic acid was increased gradually. Therefore, the NADH oxidation can release the feedback inhibition, and thus the metabolism were affected toward the activation of the TCA cycle.

**Effect of nicotinic acid on the metabolism in *arcB* gene knockout *Escherichia coli* for NADH oxidation.**

○Syed Nizam, Kazuyuki Shimizu  
(Kyushu Inst. Tech.)

**Key words** *Escherichia coli*, *arcA/B*, Metabolic regulation

**1A10-5 新規エタノール発酵細菌・ザイモバクターの発酵特性改良**

○荻野 彩, 四宮 美由紀, 岡本 賢治, 築瀬 英司  
(鳥取大・工・生応工)

【目的】現在、温暖化ガス削減のための化石燃料に代わるエネルギー源として、発酵菌を利用した未利用バイオマス資源からのバイオエタノール生産が注目されている。演者らは、未利用のリグノセルロース系廃棄物から高効率でエタノールを生産する発酵細菌の代謝工学的育種を検討している。これまでに、新規なエタノール発酵細菌であるザイモバクター (*Zymobacter palmae*) にヘミセルロース由来のキシロースやマンノースの並行発酵性を付与することに成功している。今回は、実用的なバイオエタノール生産プロセスを前提として、発酵速度低下の原因となるストレス（発酵温度、エタノール濃度、酸）に耐性をもつ *Zb. palmae* の育種を検討した。【方法と結果】発酵プロセスにおいて発生する発酵熱の冷却エネルギー消費を考慮して、*Zb. palmae* の高温発酵性付与を目標とした。従来の発酵菌である *Saccharomyces cerevisiae* や *Zymomonas mobilis* はその最適発酵温度を30℃付近にもつ。*Zb. palmae* の発酵温度を詳細に検討した結果、37℃に最適生育温度を示し、*Zb. palmae* が比較液高い温度での発酵を特徴としていることが明らかになった。そこで、*Zb. palmae* に対してUV処理やEMS等の化学薬剤処理による突然変異誘発と馴養により、更なる高温発酵性、高濃度エタノール耐性、耐酸性を獲得した実用菌の取得を検討した。

**Improvement of ethanol productivity of a novel alcohol-producing bacterium, *Zymobacter palmae***

○Aya OGINO, Miyuki SHINOMIYA, Kenji OKAMOTO,  
Hideshi YANASE  
(Dept. Biotech., Tottori Univ.)

**Key words** bioethanol, biomass, acclimation, *Zymobacter*