

2Gp14 酢酸を電子受容体とするグリセロールからのコハク酸生産○堺 繁嗣¹, 新井 博之¹, 石井 正治¹, 五十嵐 泰夫¹
(¹東大院・農生科・応生工)

【背景と目的】グリセロールはバイオディーゼル産業の副産物であり、一般的糖質と比較し高い還元性を有する有用な発酵原料である。グリセロールから酸化還元バランスを維持して一般的な発酵経路で生産されうるものとしてエタノールあるいはコハク酸が挙げられ、大腸菌野生株によりグリセロールを発酵代謝させるとエタノールに変換されることが知られている。本研究では大腸菌の遺伝子破壊株を用い、グリセロールを原料とした炭酸固定発酵によるコハク酸の生産について検討した。

【方法と結果】*E. coli* K-12 株を基に嫌気条件でのビルビン酸代謝経路を低減させた *ΔpflBΔldhA* 株を作成したところ、本株はグリセロールを添加した栄養培地でコハク酸を主産物として生成した。本株はグリセロールを添加した無機塩培地ではコハク酸を生産できなかったが、微好気条件において酢酸塩を添加することでコハク酸生産が認められ、副産物としてエタノールを生成した。グリセロール、炭酸塩、酢酸塩のそれぞれを¹³C安定同位体によりラベルした代謝産物解析により、コハク酸がグリセロールと炭酸ガスから生成していること、及びエタノールが酢酸から生成していることが示された。また発酵副産物として新たにビルビン酸が検出されたことから、酢酸のエタノールへの変換は主にビルビン酸の蓄積が原因で過剰となったNADHの再酸化経路として機能していると示唆された。

Succinate production from glycerol with acetate as an electron sink○Shigetsugu SAKAI, Hiroyuki ARAI, Masaharu ISHII,
Yasuo IGARASHI
(Dept. Biotech., Univ. Tokyo)**Key words** succinate, glycerol, metabolic engineering, biomass refinery**2Gp16 CE-TOFMS を利用した ¹³C 代謝流束解析と回分培養での代謝の時間変化解析**○戸谷 吉博¹, 石井 伸佳¹, 中東 憲治¹, 平沢 敬¹, 曾我 朋義¹,
富田 勝¹, 清水 和幸^{1,2}
(¹慶大・先端生命研, ²九工大・情工・生命情報工)

【目的】GC-MSやNMRを用いた従来の¹³C代謝流束解析では、細胞を加水分解して得られるアミノ酸の同位体分布に基づいているため、本質的に連続培養にしか適応できず、産業的に重要な回分培養などの代謝の時間変化解析ができない。そこで本研究では、CE-TOFMSを利用して、細胞内中間代謝物の同位体分布を測定し、回分培養での代謝流束の時間変化解析を行った。

【方法と結果】大腸菌野生株 BW25113 とその *pykFA* 遺伝子欠損株 (*pykF* と *pykA* の二重欠損) および *pgi* 遺伝子欠損株 (JW3985) の好気回分培養における同位体標識実験を行った。培養途中で1時間毎の代謝物濃度および同位体分布を測定し、各時間における代謝流束分布を推定した。その結果、野生株の対数増殖期では酢酸合成の低下に伴い TCA 回路の流束が増加した。また、増殖速度が遅くなると補充反応の流束が低下し、代わりにグリオキシル酸経路を活性化することでオキサロ酢酸を補充することが分かった。*pykFA* 遺伝子欠損株では解糖系の中間代謝物が蓄積し、それに伴う阻害によって解糖系全体の流束が培養経過と共に低下した。一方、*pgi* 遺伝子欠損株では ED 経路やグリオキシル酸経路を利用するという特徴が見られたが、培養を通して殆どの中間代謝物濃度は一定で、大きな流束の変化は見られなかった。

¹³C-Metabolic flux analysis using CE-TOFMS and time-course analyses of *Escherichia coli* metabolism in batch cultures○Yoshihiro TOYA¹, Nobuyoshi ISHII¹, Kenji NAKAHIGASHI¹,
Takashi HIRASAWA¹, Tomoyoshi SOGA¹, Masaru TOMITA¹,
Kazuyuki SHIMIZU^{1,2}
(¹Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., ²Dept. Biosci. & Bioinfor., Kyushu Inst. Tech.)**Key words** ¹³C-Metabolic flux analysis, batch culture, *pykFA* mutant, *pgi* mutant**2Gp15 酢酸生産菌 *Gluconacetobacter obediens* の培養特性と ¹³C-フラックス解析**Sarkar Dayanidhi¹, 藪崎 正広³, 長谷部 雄太¹, ○上野 愛佳¹,
高本 秀司³, 清水 和幸^{1,2}
(¹九工大院・情工, ²慶応大, ³ミツカングループ)

【目的】食酢醸造には、*Acetobacter* 属ならびに *Gluconacetobacter* 属酢酸菌が利用されているが、酢酸菌の代謝機構についてはまだよく分かっていない。そこで本研究では、赤ワイン酢醗酵液から分離された酢酸菌、*G. oboediens* を使い、グルコースやエタノール、グルコン酸が培養特性に及ぼす影響を検討した。さらに、炭素同位体を用いた代謝フラックス解析を行った。

【方法と結果】*G. oboediens* DSM11826 を、好気条件下において合成培地を用いた回分および連続培養を行った。グルコースならびにエタノールを炭素源とした系では、供給グルコース濃度の上昇させた場合、細胞濃度、酢酸濃度ともに上昇が認められた。一方、供給エタノール濃度を上昇させた場合、酢酸濃度の若干の上昇ならびに細胞濃度の低下が認められた。また、グルコン酸をある程度添加した場合、細胞濃度ならびに酢酸濃度の上昇が認められた。同位体実験は、[I-¹³C]グルコースと[U-¹³C]グルコースの混合物を供給して培養を実施し、GC-MS分析から同位対比を算出し、細胞内代謝フラックス分布を求めた。グルコースならびにエタノールを炭素源とした系での結果からは、(1) グルオキシル酸経路の寄与が低下し、(2) TCA 回路が活性化されることが示唆された。ここで、エタノール濃度を更に高めた場合、TCA回路の活性が低下することが示唆された。

Fermentation characteristics and ¹³C metabolic flux analysis of acetic acid bacteria *Gluconacetobacter oboediens*Dayanidhi SARKAR¹, Masahiro YABUSAKI³, Yuta HASEBE¹,
○Aika UENO¹, Hideshi KOHMOTO³, Kazuyuki SHIMIZU^{1,2}
(¹Grad. Sch. of Comp. Sci. and Sys. Eng., Kyusyu Inst. Tech., ²Keio Univ., ³Mizkan Group)**Key words** *Gluconacetobacter oboediens*, ¹³C labeling experiment, metabolic flux analysis, acetate fermentation**2Gp17 増殖促進物質によるビフィズス菌の酵素活性について**○渡辺 愛¹, 笈木 宏和²
(¹久留米高専・専・物質工, ²久留米高専・生物応用化学)

人間や動物の腸管内に通常存在するビフィズス菌は、宿主の健康に大きく貢献する。ビフィズス菌は生育に増殖促進物質という特殊な栄養源を必要とするが、現在までのところ、増殖促進物質の研究はほとんどが菌生育の良し悪しについてしか考慮されておらず、増殖における代謝作用の変化について検討されたものはほとんど存在しない。そこで、基礎研究の観点からビフィズス菌を用いて、増殖促進物質の違いにより生産される以下の酵素の分泌量がどのように変化するかについての比較・検討を行った。

①胞胆汁酸分解酵素：腸内には胞胆汁酸(グリリコール酸、タウロコール酸)という物質があり、コレステロールの吸収を促進させる。この物質をビフィズス菌の分泌する胞胆汁酸分解酵素が胆汁酸に分解しコレステロールの吸収を抑制する。

グリリコール酸の場合、3 種類共に増殖促進物質による酵素の分解能増加はみられなかったが、タウロコール酸の場合、*infantis*においては高い生育の促進が確認され、*bifidum*・*breve*は増殖促進物質の添加により酵素の分解能が非常に高くなった。

②スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)：活性酸素は、過剰増加すると癌やシミ・皺等私たちの体にとって有害な物質になる。そこで、SODを分泌するビフィズス菌の経口摂取が効果的となる。どの菌においても、増殖促進物質を加えた培地の生育が促進し、SOD活性については基本培地より活性の減少が確認された。いずれの増殖促進物質を加えた培地でも *breve* が最も SOD 活性が高く、*infantis*・*bifidum* では *infantis*が *bifidum* より若干活性が高いという結果となった。

Effects of enzymatic activity from *Bifidobacterium* with growth stimulator○Ai WATANABE¹, Hirokazu OIKI²
(¹Dept. Mat. Eng., Adv. Course, Kurume Natl. Col. Tech., ²Dept. Biochem. Appl. Chem., Kurume Natl. Col. Tech.)**Key words** *Bifidobacterium*, Growth Stimulator