

3A09-3 固定化リパーゼを用いた新規なバイオディーゼル燃料生産

○杉山 英彦¹, 今枝 孝夫¹, 加藤 且也², 高橋 治雄¹
(¹豊田中研,²産総研)

【目的】バイオマスをエネルギー源として利用する方法の一つとして植物油をエステル化して用いるバイオディーゼル燃料（BDF）が注目を集めている。BDFは硫黄分をほとんど含まないなど軽油と比べてクリーンな排ガスを排出する長所を持ち合わせている。BDF生産方法の中でリパーゼ等の酵素触媒を用いる手法は、排出物が理論上ゼロとなるなどのメリットがある。しかし、酵素触媒は触媒コストがアルカリ触媒に比べ高コストとなること、リパーゼが原料であるアルコールに対して不安定であることなどが短所としてあげられる。今回はリパーゼの固定化法の改良と乳化前処理により上記問題を改善し、エステル化効率を向上させることを目的として検討を行った。

【方法および結果】ナタネ油 1.1mmol とメタノールまたはエタノール 2.2mmolを混合し、ホモジナイザ（POLYTRON PT10-35 KINEMATICA社製）で5,000rpm、10秒～3分間ホモジナイズ後、固定化リパーゼによるエステル交換反応を行った。また、同時に光散乱の測定（ELS-8000、大塚電子製）を行い、光散乱より算出したエマルジョン中のメタノール粒径と酵素によるエステル交換率との関係と比較した。その結果、フェニル基を有するシランカップリング剤を結合したシリカ担体を用いることでリパーゼの安定性を大幅に向上することができた。さらに乳化前処理を加えることによりアルコールのエステル交換反応効率が上昇し、特にエタノールの反応効率が最も優れていた。

Novel method for biodiesel fuel production using immobilized lipase

○Hideohiko SUGIYAMA¹, Takao IMAEDA¹, Katsuya KATO², Haruo TAKAHASHI¹
(¹Toyota Cent. R&D Labs. Inc., ²Nat. Inst. Adv. Ind. Sci. Technol.)

Key words biodiesel fuel, lipase, biomass, transesterification

3A09-5 フタル酸エステル分解菌の産生するフタル酸モノエステル分解酵素の性質

○西岡 嗣浩¹, 岩田 眞人², 杉野 浩幸¹, 藤井 隆夫¹
(¹崇城大・応生命,²アイ・エム・ビー株式会社)

【目的】フタル酸ジエチルヘキシル（DEHP）をはじめとするフタル酸エステル類は内分泌攪乱物質として知られている。我々はすでに新規のDEHP分解菌である*Gordonia* sp.P8219株を分離した。P8219はDEHPに吸着すること、フタル酸資化能がないなど特異な性質があった。そこで、細胞内にDEHP加水分解酵素系を持っていると考え、これを精製し、その性質を調べることを目的とした。

【方法】DEHPによる誘導を行ったP8219細胞からcell-free extractを調製し、各種クロマトグラフィーによって酵素の精製を行った。おもにフタル酸モノエステル（MEHP）を基質とし、加水分解物であるフタル酸を高速液体クロマトグラフィーで測定し、MEHP加水分解酵素活性を求めた。

【結果】精製したMEHP加水分解酵素は、SDS-PAGEでは、分子質量30 kDa付近に単一のバンドを与えた。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーでは約60 kDaであったことから、P8219株の産出するMEHP分解酵素はホモ2量体であると考えられた。MEHP加水分解酵素の反応最適温度は、45℃で、反応最適pHは、7.0～8.0であった。細菌の細胞内にDEHP分解酵素系があるとの報告はなく、また、細菌由来のMEHP加水分解酵素の報告はなく、本MEHP加水分解酵素は新規の酵素と考えられる。

Characterization of monoethylhexyl phthalate esterase from *Gordonia* sp. P8219

○Tuguhiko NISHIOKA¹, Makoto IWATA², Hiroyuki SUGINO¹, Takao FUJII¹
(¹Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ., ²iMb Co. Ltd.)

Key words *Gordonia*, Diethylhexyl phthalate, Monoethylhexyl phthalate, esterase

3A09-4 2,4,6-トリクロロフェノール分解菌 *Ralstonia pickettii* DTP0602株のパラ位水酸化に関与する酵素の機能解析

○米原 保¹, 八田 貴¹, 滝沢 昇², 浄原 法藏²
(¹岡山理大・技科研,²岡山理大・工・応化)

【目的】*Ralstonia pickettii* DTP0602株は初発水酸化酵素(HadA, HadB)により2,4,6-トリクロロフェノール(2,4,6-TCP)のパラ位に水酸基を導入する。HadAが基質の水酸基導入に関わり、HadBはHadAの活性促進作用があり電子伝達に関わっていると予想される。*hadA*, *hadB*の直上流には2,4,6-トリクロロフェノキシ酢酸分解に関与する*tftC*と有意な相同性のある*hadE*が存在しており、HadEは分解に関与している可能性がある。今回、HadEを高発現させHadEの精製とその機能解析を行った。

【方法と結果】HadEを高発現させるため、pET-20bに挿入した場合の*hadE*のm-RNAのSD配列及び開始コドンが複雑な2次構造をとらないようにDNA配列を改変した。大腸菌中で高発現したHadEを各種クロマトグラフィーによって収率65%、精製倍率17倍に精製し、電気泳動的に単一であった。本酵素はNADH存在下でFAD特有の吸収スペクトルが消失し、FADが還元された。このことから、HadEはFADレダクターゼであることが明らかになった。また、至適pHはpH6.5で最適温度は40℃だった。HadAは2,4,6-TCP分解にFADH₂を必要と予想されることから、このHadEによって供給されていると予想される。現在、HadEのさらなる機能解析を行っている。また、電子伝達に関わる酵素HadBについての機能も検討中である。

Characterization of hydroxylase in 2,4,6-trichlorophenol-degrading *Ralstonia pickettii* DTP0602

○Tamotsu YONEHARA¹, Takashi HATTA¹, Noboru TAKIZAWA², Hohzoh KIYOHARA²
(¹Res. Ins. Tec., Okayama Univ. Sci., ²Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words 2,4,6-Trichlorophenol, *Ralstonia pickettii*

3A10-1 炭酸固定反応を触媒する4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の反応特性と一次構造解析

○松井 剛, 吉田 豊和, 長澤 透
(岐阜大・工・生命工)

【目的】我々は炭酸固定反応を触媒する脱炭酸酵素を見だし、その特性解明と、芳香族化合物の位置選択的カルボキシ化への応用を検討している。今回は、幅広い微生物種に活性を見出した4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素について反応特性を検討し、遺伝子クローニングと一次構造解析を行った。

【方法・結果】強い4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素活性が土壌から分離した*Enterobacter cloacae* P240に認められ、精製酵素を用いて反応特性を検討した結果、KHCO₃をCO₂源とする反応系でフェノールへの炭酸固定反応を触媒した（モル変換率12%）。精製酵素のN末端アミノ酸配列および可逆的脱炭酸酵素での保存アミノ酸配列を活用し、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素遺伝子をクローニングした。*Escherichia coli*, *Salmonella* 属細菌などで95%以上の相同性を示す機能未同定タンパク質が認められた。ピロール-2-カルボン酸やインドール-3-カルボン酸の脱炭酸酵素と有意な相同性を示したが、2,6-ジヒドロキシ安息香酸との相同領域は認められず、可逆的な脱炭酸酵素群は一次構造が異なる2つのグループに分類できることが判明した。

Characterization and structural analysis of 4-hydroxybenzoate decarboxylase reversibly catalyzing nonoxidative decarboxylation

○Tsuyoshi MATSUI, Toyokazu YOSHIDA, Toru NAGASAWA
(Dept. Biomol. Sci., Gifu Univ.)

Key words 4-hydroxybenzoic acid, carboxylation, decarboxylase, gene cloning