

固定化酵素フィルタを用いた蟻酸除去技術の開発

森川 豊^{*1}、近藤徹弥^{*2}、東 輝彦^{*3}、戸谷精一^{*4}

Development of Technique for Degrading Formic Acid by Enzyme Filter

Yutaka MORIKAWA, Tetsuya KONDO
Teruhiko HIGASHI and Seiichi TOTANI

Food Research Center,AITEC^{*1,2,4}、Chubu University^{*3}

ホルムアルデヒドの酸化により生成する蟻酸を除去するために、当センターが新規に取得した蟻酸酸化酵素（FOX）を用いた空気清浄機用フィルタの開発を行った。フィルタ用の吸着剤を想定したシリカゲルに FOX を様々な方法で固定化した。グルタルアルデヒド架橋法を用いた固定化酵素は、粗酵素液に比べて熱安定性が向上した。また、固定化することにより保存性も向上し、30℃で1ヶ月以上活性を維持することができた。

1. はじめに

国土交通省が平成15年7月に建築基準法を改正するなど、ここ数年、いくつかの省庁において、室内環境汚染の対策が採られている。それに伴い、汚染対象物質の種類が増えるのみでなく、ホルムアルデヒドの酸化により発生する蟻酸などの例にみられる二次的な汚染も注目され始めている。蟻酸は高濃度になると喘息の原因になると言われ、室内環境中の蟻酸濃度とホルムアルデヒド濃度の関係を調査した報告や酸化機能のある空気清浄機から排出される蟻酸を測定した報告もある。各家庭・事業所においても、住空間の空気環境への関心が高まり、家庭用・業務用共に空気清浄機の販売台数が年々増加している。このような中、新規な空気清浄方法として、酵素を利用する技術が注目され、セルラーゼやリゾチーム等数種類の酵素を用いた除菌フィルタが開発され、製品化されている。これまでに愛知県産業技術研究所では、愛知県の土壌から新規に分離した微生物よりアルコール酸化酵素を取得し、ホルムアルデヒドを除去するフィルタを開発している。本研究では、愛知県産業技術研究所が取得した蟻酸酸化酵素（FOX）を用いた空気清浄機フィルタの開発を目的としている。FOXは熱安定性、保存性が悪いので固定化酵素によりこれらの性能を向上させることを試みた。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

愛知県内の土壌から取得したホルムアルデヒド耐性カビの内¹⁾、最も蟻酸酸化酵素活性（FOX活性）が高か

った株 *Aspergillus nomius* (IRI013 株)²⁾ を試験に用いた。

2.2 蟻酸酸化酵素の粗精製

ホルムアルデヒド1%を添加した培地で培養した菌体を集菌、凍結後破碎した。破碎した菌体を同重量の10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)に懸濁し、濾紙で吸引濾過した。濾液を硫酸アンモニウムで塩析した後、透析したものを粗酵素液とした。

2.3 FOX 活性の測定

既報^{2) 3)} に準じて測定した。

2.4 固定化酵素の作製

テトラヒドロフラン（THF）またはエタノール＋イオン交換水（3mL＋6mL）中に N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）1.2g を投入し、DCC 溶液を調製した。粗酵素液を含浸させたシリカゲル（富士シリシア㈱ CARIACT Q-100 アミノ処理品）に DCC 溶液を投入し 4℃で4日間攪拌した。ゲルを濾過回収後、十分量の水、1M食塩水、0.1Mの酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）の順で洗浄した。濾紙で余剰の液を脱水した後、乾燥させたものをペプチド結合ゲルとした。

所定量のシリカゲルに25%グルタルアルデヒド溶液を含浸させ、室温で1時間攪拌した。シリカゲルを濾過・回収後、十分量のイオン交換水で洗浄した。濾紙で余剰の液を脱水した後、粗酵素液を含浸させ4℃で一晩静置した。再度、濾紙で余剰の液を脱水した後、ポンプを用いて吸引し乾燥させたものをグルタルアルデヒド架橋ゲルとした。

3. 実験結果及び考察

*1 食品工業技術センター 加工技術室 *2 食品工業技術センター 応用技術室 *3 中部大学

*4 食品工業技術センター 発酵技術室

3.1 様々な固定化酵素の FOX 活性

様々な手法を用いて作製された固定化酵素の中で、グルタルアルデヒド架橋ゲル及びエタノールを用いたペプチド結合ゲルの FOX 活性が高かった (図1)。ペプチド結合ゲルでは反応溶媒にエタノールを用いると THF を用いた場合の倍以上の活性となった。THF による失活が原因と見られ、反応溶媒の濃度や種類に検討の余地があるものと考えられた。なお、得られたゲルの活性の総和は、使用した酵素溶液の総活性の1割以下であった。ゲル内部への基質溶液の浸透時間による反応速度の低下や固定化時の FOX 失活に原因があると考えられた。

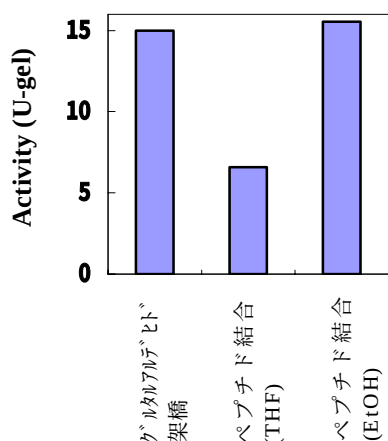


図1 様々な固定化酵素の FOX 活性

3.2 FOX 活性の熱安定性

粗酵素液及び様々な固定化酵素を 30℃から 60℃の環境で1時間加熱した後に、FOX 活性を測定した。図2に粗酵素液及びグルタルアルデヒド架橋した固定化酵素の試験結果を示した。粗酵素液の FOX 活性は、35℃まではほぼ初発の活性を維持したが 40℃で初期の 80%に低下し、50℃で10%未満になった。グルタルアルデヒド架橋法を用いた固定化酵素では、活性が 40℃で初期の 80%に低下したが、50℃でも 70%近い活性を残した。なお、ペプチド結合した固定化酵素の FOX 活性は、40℃でほぼ完全に失活した。

3.3 FOX 活性の保存性

粗酵素液及びグルタルアルデヒド架橋法を用いた固定化酵素を 4℃、30℃の環境に静置し、所定日数後の FOX 活性を測定した (図3)。30℃で保存した粗酵素液の FOX 活性は、7日目にはほぼ完全に失活した。また、4℃で保存した粗酵素液の FOX の活性は、2週間で初期の5分の1に低下し、4週間後には初期の10%以下に失活した。一方、グルタルアルデヒド架橋した固定化酵素の FOX 活性は、保存開始37日目において、4℃で保存区では初発の95%以上、30℃保存区でも80%以上の活性を維持した。

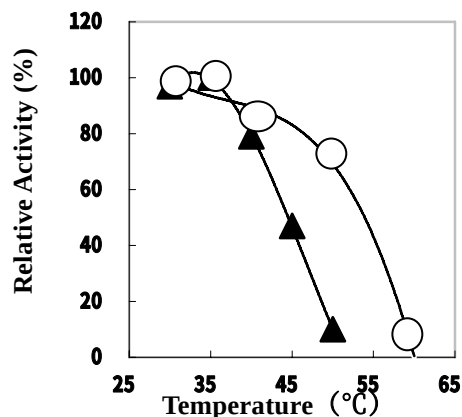


図2 FOX 活性の熱安定性
未加熱を 100%とした
○ 固定化酵素 (グルタルアルデヒド架橋)
▲ 粗酵素液

固定化により FOX 活性の保存性を向上することができた。しかし、空気清浄機のフィルタは最低でも6ヶ月は使用する。更に、長期間の保存試験を行うと共に、高温領域 (40℃、50℃) での保存性も今後検討したい。

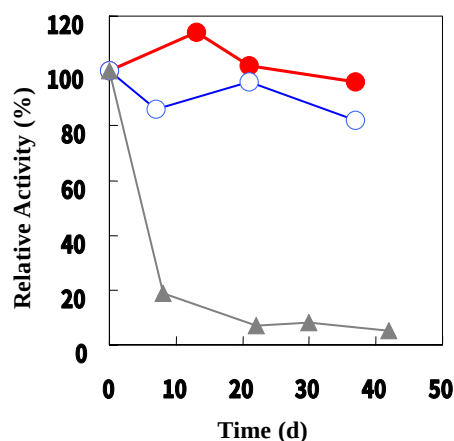


図3 FOX 活性の経日変化
初期の値を 100%とした
● 4℃保存固定化酵素 (グルタルアルデヒド架橋法)
○ 30℃保存固定化酵素 (グルタルアルデヒド架橋法)
▲ 4℃保存粗酵素液

4. 結び

グルタルアルデヒド架橋法により FOX を固定化したところ、熱安定性、保存性を向上することができた。今後は、空気清浄機の使用実態に適した期間・温度での保存試験を実施する必要がある。また、先に試作したアルコール酸化酵素による、ホルムアルデヒド除去フィルタとの併用を試み、ホルムアルデヒドを二酸化炭素と水にまで酸化できるフィルタの開発を試みる予定である。

文献

- 1) 特開 2003-052355
- 2) T.Kondo et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **214**, 137(2002)
- 3) 森川ら: 愛知県産業技術研究所研究報告, **1**, (2002)

