

固定化酵素を用いた蟻酸除去技術の開発

誌名	愛知県産業技術研究所研究報告
ISSN	13479296
著者名	森川,豊 近藤,徹弥 間瀬,雅子 新海,雄也 北野,道雄
発行元	愛知県産業技術研究所
巻/号	5号
掲載ページ	p. 154-155
発行年月	2006年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



研究ノート

固定化酵素を用いた蟻酸除去技術の開発

森川豊*¹、近藤徹弥*²、間瀬雅子*³、新海裕也*⁴、北野道雄*³

Development of Technique for Degradation of Atmospheric Formic Acid by immobilized Enzyme

Yutaka MORIKAWA*¹, Tetsuya KONDO*², Masako Mase*³,
Yuuya SHINKAI*⁴ and Michio KITANO*³Food Research Center, AITEC*^{2~4} Chubu University, College of Bioscience and Biotechnology *⁵

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、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として想定したシリカゲルに、FOX をグルタルアルデヒド架橋法により固定化した。酵素固定化ゲルは中性から弱酸性での熱安定性が高く、40℃で 100 日以上活性を維持した。また、酵素固定化ゲルに蟻酸ガスを連続的に通気したところ、酵素が無い場合に比べより長期間蟻酸除去ができることを確認した。

1. はじめに

室内で過ごす時間が極めて長い現代人は、1 日に体内に摂取する物質の約 60% を室内空気が占めているといわれ、その質 (空気質) が問題となっている。室内空気汚染物質には揮発性有機化合物 (VOC) がある。シックビルディング症候群、シックハウス症候群、シックスクール症候群といった様々な建築物内の問題に対処するため、各省庁で VOC 濃度の指針値等が設けられた。近年では、建築物以外の居住空間の空気質にも関心が及び、シックカー症候群対策として日本自動車工業会が 2007 年以降の新車内の VOC 指針値を掲げた。空気質を汚染する VOC の中でも、ホルムアルデヒドは使用量が多く製品残留期間が長いために、国内において最も古くから指針値が設けられた物質の一つである。最近では、プラズマや触媒などによる様々な酸化機構を用いた空気清浄機によるホルムアルデヒド除去が行われているが、ホルムアルデヒドの酸化により発生する蟻酸などの、空気質の二次汚染物質まで配慮する必要が生じている。

これまでに当研究所では、新規に取得した微生物由来のアルコール酸化酵素を用い、ホルムアルデヒド除去フィルタを開発している¹⁾²⁾。また、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、FOX をシリカゲルに固定化することにより耐熱性を向上できることを確認している³⁾⁴⁾。

本研究では FOX を固定化したゲル (以下、酵素固定化ゲル) の pH 安定性、長期保存性を確認すると共に、酵素固定化ゲルが蟻酸ガスを除去する能力を検討した。

2. 実験方法

2.1 蟻酸酸化酵素 (FOX) の粗精製

既報³⁾と同様に精製を行い、得られた透析液を粗酵素液とした。

2.2 固定化酵素の作製

所定量のシリカゲル (富士シリシア (株) 製 CARIACTQ-80) に対し、既報³⁾に準じて FOX をグルタルアルデヒド架橋した。なお、表面がシラノール基のままであるシリカゲルを未処理品、未処理品にアミノプロピルトリエトキシシランをカップリング処理したものをアミノ処理品とした。

2.3 FOX 活性の測定

粗酵素液の活性測定は既報³⁾に準じた。酵素固定化ゲルの活性測定は、粗酵素液の代わりに酵素固定化ゲルを活性測定液中に投入して行った。所定時間、180rpm で振とうした後のキノン生成に伴う 505nm の吸光度の増加を測定し、単位時間あたりの吸光度増加から活性を求めた。測定は 30℃で行った。

2.4 蟻酸吸着試験

シリカゲル各 1g を容器に量り取った。さらに、40mM の蟻酸溶液を 3mL 投入し、4℃で一晩浸せきした。濾過によりゲルを除去した後の溶液中の残存蟻酸濃度を HPLC で測定し、吸着前の蟻酸濃度との差からゲルの蟻酸吸着量を求めた。

2.5 酵素固定化ゲルによるガス中の蟻酸除去試験

所定濃度の KOH 溶液 0.2mL をシリンジで固相吸着剤 (Waters (株) 製 Sep-pack Plus C18) に含浸させた。そ

*1 食品工業技術センター 加工技術室 (現食品工業技術センター 応用技術室) *2 食品工業技術センター 応用技術室 *3 食品工業技術センター 加工技術室 *4 中部大学 応用生物学部

の後、80℃で乾燥し蟻酸捕捉カートリッジとした。

酵素固定化ゲル 2g を投入したカラムに蟻酸ガスを通気させた。カラム通過ガス中の蟻酸を蟻酸捕捉カートリッジに捕集し、イオン交換水 25mL で溶出させた。溶出液中の蟻酸濃度を HPLC によって測定した。試験は 25℃ の環境で行い、ガス流速は約 0.4mL/min とした。なお、対照には、FOX を固定化していないシリカゲルを用いた。

3. 実験結果及び考察

3.1 pH 安定性

固定化酵素ゲルを pH3.0 から 10.0 の緩衝液中において 50℃、60 分加熱処理した後に、FOX 活性を測定した (図 1)。加熱後の酵素固定化ゲルの FOX 活性は、pH5.0 から 6.0 の範囲で高い値を示し、pH4.0 以下及び 8.0 以上では最大値 (pH6.0) の 4 割以下となった。また、pH 5.0 において、加熱前の約 75% の活性を保持していた。

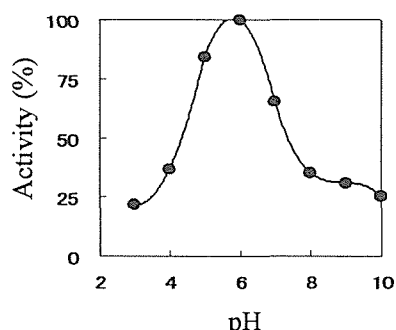


図 1 FOX 活性の pH 安定性 (50℃、1h 加熱)
最大値を 100% とした。

3.2 シリカゲルの蟻酸吸着試験

CARiACTQ-80 未処理品に比べ、CARiACTQ-80 アミノ処理品は、非常に多くの蟻酸を吸着し (表 1)、グルタルアルデヒド架橋を施すことにより、蟻酸吸着量は減少するものの、酵素を固定化することにより 7.77mg-HCOOH/g-gel とさらに多くの蟻酸を吸着した。酵素固定化ゲルの蟻酸吸着量の値は、以前に試作したホルムアルデヒド除去フィルタ²⁾ に使用したゲルのホルムアルデヒド吸着 (0.25mg-HCHO/g-gel) に比べ十分に大きい値であった。

表 1 担体 (シリカゲル) の蟻酸吸着試験

シリカゲル	HCOOH 吸着量 (mg-HCOOH/g-gel)
対照 ^a	0.00
CARiACTQ-80 未処理品	0.02
CARiACTQ-80 アミノ処理品	6.18
グルタルアルデヒド処理	4.46

a シリカゲル無し。

3.3 長期保存性

グルタルアルデヒド架橋法を用いた酵素固定化ゲルを 30℃、40℃ 及び 50℃ の環境に静置して、所定日数経

過後に、FOX 活性を測定した (図 2)。保存後の酵素固定化ゲルは、30℃ では 130 日以上、40℃ では 100 日以上、4U/kg-gel を越える活性を維持した。しかし、50℃ 保存では 2 週間で活性がほとんど消失した。また、試験開始直後に活性が 3 割程度に落ちたがその後は安定した。30℃、40℃ の異なる温度条件下でもほぼ同程度の活性で維持されることから、試験開始直後に失活したのは、完全に固定化されなかった FOX であると考えられた。

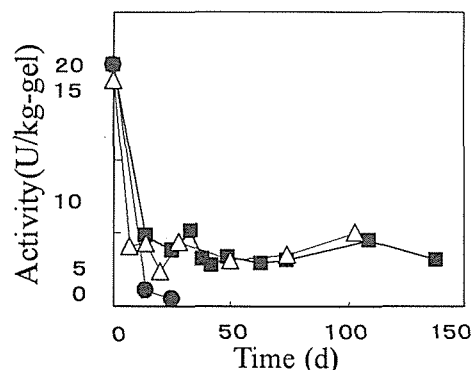


図 2 FOX 活性の経日変化

● 50℃、△ 40℃、■ 30℃

3.4 ガス中の蟻酸除去試験

酵素固定化ゲルに 80 から 108 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の蟻酸ガスを連続的に通気したところ、16 日後も 26% 以上の蟻酸を除去した (表 2)。酵素の無いゲルが 9 日で蟻酸を除去できなくなったことから、酵素によりゲルの蟻酸飽和を防止できることが確認された。

表 2 酵素固定化ゲルによる気相中の蟻酸除去

シリカゲル	$\Delta\text{HCOOH}(\%)^a$			
	0d	1d	9d	16d
酵素有り	100.0	68.4	23.7	26.3
酵素無し	100.0	21.1	0.0	0.0

a カラム通過前の蟻酸濃度 80-108 ($\mu\text{g}/\text{m}^3\text{-gas}$) を 100% とした。

4. 結び

蟻酸化酵素は、シリカゲルにグルタルアルデヒド架橋法で固定化することにより 40℃ の環境下で 100 日以上の間、約 4 U/kg-gel の活性を保持した。今後は、フィルタ製品を想定して長期間 (6 か月以上) の保存試験を実施する予定である。

また、ガス中の蟻酸を吸着後除去する性能の向上を目的に、固定化する酵素量を増やす等の改善を行う。

文献

- 1) 特許第 3774774
- 2) 特開 2003-052355
- 3) 森川ら: 愛知県産業技術研究所研究報告, 4, 162 (2005)
- 4) T. Kondo *et al.*: FEMS Microbiol. Lett., 214, 137 (2002)