

VOC分解酵素の活用技術の開発

～ 蟻酸酸化酵素の性質 ～

森川豊^{*1} 近藤徹弥^{*2} 林直宏^{*2} 福田徳生^{*3}
福田聡史^{*4} 酒井昌夫^{*4} 高須恭夫^{*4}、

Development of Technology with VOC-degrading Enzymes

～ Characterization of formate oxidase ～

Yutaka MORIKAWA, Tetsuya KONDO, Naohiro HAYASHI, Norio FUKUDA,
Satoshi FUKUTA, Masao SAKAI and Yasuo TAKASU

Research and Development Division, AITEC^{*1} Food Research Center, AITEC^{*2}
Technical Consulting Division, AITEC^{*3*4}

室内環境汚染物質であるホルムアルデヒドの酸化により発生する蟻酸は、喘息の原因になると言われている。酵素を用いた VOC 分解除去法を構築する目的で、蟻酸を分解する酵素の検索を行ったところ、ホルムアルデヒド耐性を有するカビ IRI013 株の無細胞抽出液に蟻酸酸化酵素 (FOX) 活性が確認された。本酵素の発現は培地中の炭素源により誘導され、ホルムアルデヒドを含む培地で培養したときに最も活性が高かった。本酵素は酸性条件下で活性が高く、35 付近まで温度安定性を有した。

1. はじめに

建材、家具等に用いられる塗料や接着剤から放散される VOC (揮発性有機化合物) は、シックハウス症候群の原因物質として危惧されている。蟻酸は室内環境中のホルムアルデヒドが酸化されることにより発生し、喘息の原因になると言われている。これら VOC の除去対策として生体材料 (微生物、酵素) を用いた手法が検討されている¹⁾。そこで本研究では、蟻酸酸化酵素を有する微生物を探索し、無細胞抽出液を用いて酵素の性質を調べた。

2. 実験方法

2.1 微生物

既報²⁾により単離したホルムアルデヒド耐性カビの中から、蟻酸分解能力を有する株を探索した。特に述べない限り、培地の炭素源をホルムアルデヒド 0.1%、グルコース 1.0%とし、基本培地組成及び培養条件は既報²⁾のとおりとした。

2.2 無細胞抽出液の酵素活性

2.2.1 無細胞抽出液の作製

培養した菌体を濾別し、-30 で凍結した。凍結した菌体を破碎し、0.1M リン酸緩衝液を用いて回収した。回収液を 12,000rpm、15min の条件で遠心分離し、その上澄み液を無細胞抽出液とした。

2.2.2 蟻酸酸化酵素 (FOX) 活性の測定

FOX 活性の測定には、発色法による活性検出を用いた。

すなわち、100mM 蟻酸、66.7 mM リン酸ナトリウム緩衝液、0.5 mM 4-アミノアンチピリン、2 mM フェノール、ペルオキシダーゼ (10 units/ml) を含む活性測定液に無細胞抽出液を加え、直ちにキノン生成に伴う 505 nm における吸光度を経時測定した。測定は 30 で行った。なお、蟻酸添加による pH の変化がないように、蟻酸溶液には蟻酸と蟻酸ナトリウムにより調整を行い使用した。

2.3.1 タンパク質の定量

タンパク質量は牛血清アルブミンを標準タンパク質とした Lowry 法³⁾により求めた。

2.3.2 蟻酸の定量

溶液中の蟻酸の分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。蟻酸標準溶液との溶出時間の一致により同定を、ピーク面積で作製した検量線により定量を行った。分析カラムには、スルホン化ポリスチレン系 Shim-pack SCR (島津製作所) を使用し、移動相には、5mM p-トルエンスルホン酸水溶液を用いた。カラム溶出液を 100 μ M エチレンジアミン四酢酸、20mM ビス (2-ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタンを含む液に反応させた後に、電気伝導度検出器により検出した。

3. 実験結果及び考察

3.1 カビの選別

ホルムアルデヒド 0.1% を含有する培地で培養した 7

*1 基盤技術部 *2 食品工業技術センター応用技術室 *3 技術支援部材料技術室, *4 技術支援部応用技術室

株のカビの無細胞抽出液に蟻酸酸化酵素(FOX)活性が確認された(表1)

表1.カビの無細胞抽出液の蟻酸酸化酵素活性

株	属	比活性* ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
IRI004	<i>Aspergillus</i>	1.80
IRI008	<i>Botrytis</i>	0.12
IRI009	<i>Botrytis</i>	0.06
IRI013	<i>Aspergillus</i>	1.56
IRI016	<i>Paecilomyces</i>	0.09
IRI017	<i>Paecilomyces</i>	0.08
IRI020	<i>Aspergillus</i>	2.00

* 酵素活性は100mMの基質濃度により測定した

4の環境下で約1か月保存した無細胞抽出液のFOX活性を調べたところ、IRI013株の活性の低下率が最も小さかったことから、IRI013株を選別した。IRI013株について18SrDNAによる種属の同定を行ったところ、*Aspergillus nomius*と同定された。IRI013株の無細胞抽出液のFOX活性は、培地の炭素源によって誘導され、メタノールまたは蟻酸を用いるよりホルムアルデヒドを用いた場合に最も高かった(表2)。この結果から、今後の試験にはホルムアルデヒドを添加した培地で培養したIRI013株を用いることとした。

3.2 IRI013株無細胞抽出液の蟻酸酸化酵素活性の性質

IRI013株から得られる無細胞抽出液のFOX活性のpH依存性を調べたところ、酸性側の領域において高い活性を示した(図1)。また、温度安定性についてはおよそ35まで安定であった(図2)。

4. 結び

341 蟻酸を酸化する酵素としてはこれまでにNAD依存型ホルムアルデヒド脱水素酵素が知られているが⁴⁾、⁵⁾、酸素を電子受容体とする酸化酵素についてはあまり知られていない。NADの様な補酵素を用いないFOXは、酵素によるVOC分解除去法を構築する上で極めて有効であると考えられた。メタノール資化性酵母⁶⁾、⁷⁾が有するアルコール酸化酵素は、ホルムアルデヒドを酸化して蟻酸にすることが知られている。本研究のFOXとホルム

表2.様々な炭素源を含む培地で培養したIRI013株無細胞抽出液の蟻酸酸化酵素活性

炭素源 ^{*1}	比活性 ^{*2} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
0.1%CH ₃ OH	0.06
0.1%HCHO	2.73
0.1%HCOOH	0.32

*1 1%グルコースを含む基本培地への添加量

*2 酵素活性は100mMの基質濃度により測定した

アルデヒド酸化酵素との併用によるホルムアルデヒド分解除去法について今後検討を行う。

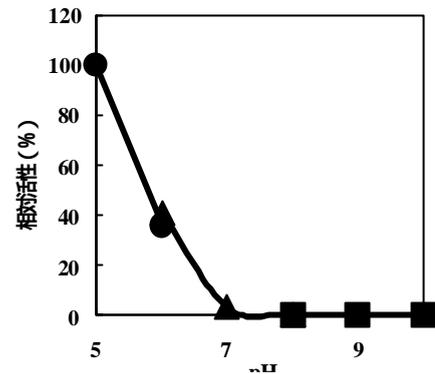


図1 IRI013株無細胞抽出液の蟻酸酸化酵素活性に対するpHの影響

活性測定は、McIlbain緩衝液()、リン酸ナトリウム緩衝液()及びホウ酸-NaOH緩衝液()を用いて行った。pH5の条件における活性を100%とした。

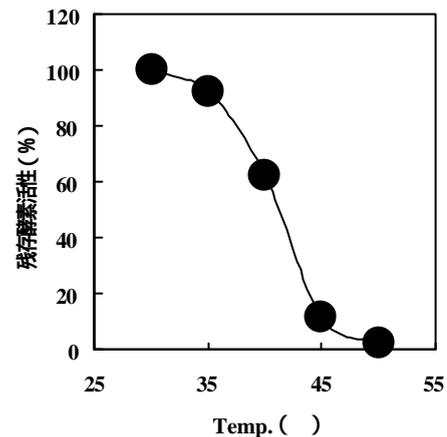


図2 IRI013株無細胞抽出液の蟻酸酸化酵素活性に対する熱の影響

0.2mlの無細胞抽出液を様々な温度中条件下に15minおいた後に、活性を測定した。熱処理を行う前の活性を100%とした。

文献

- 1)K.Okamoto, H.Yanase, J.Order Reserch and Eng., 30, 9(1999)
- 2)森川ら,愛知県工業技術センター研究報告書,37, 29,(2001)
- 3)O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, J. Biol. Chem., 38, 111, (1974)
- 4)Egorov.A.M. et.al, E.J.Biochem., 99, 569(1979)
- 5)Höpner. T. et.al, Methods Enzymol.,89,531(1982)
- 6)H.Sham, Arch.Microbiol.,105,175(1975)
- 7)N.Kato, Y.Omori, Y.Tani and K.Ogawa, E.J.Biochem., 64, 341(1976)