

VOC分解酵素の活用技術の開発 ～ホルムアルデヒド分解菌の取得と性質～

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

Development of Technology with VOC-degrading Enzymes ～ Isolation and Properties of Formaldehyde-degrading fungi ~

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

微生物及び酵素を用いたホルムアルデヒド分解除去技術の開発を目的として自然界からホルムアルデヒド分解微生物の探索を行った。170カ所の土壌および排水サンプルから、ホルムアルデヒド耐性能力を有する微生物として *Aspergillus* 属、*Botrytis* 属、*Paecilomyces* 属の3属、9株のカビを取得した。これらのカビは、これまで報告されたホルムアルデヒド分解能力のあるカビとは異なる属であった。本研究で取得されたカビは0.30～0.50%のホルムアルデヒド含有培地で増殖し、ホルムアルデヒドを分解することができた。休止菌体による水溶液中のホルムアルデヒド分解試験を行ったところ、ホルムアルデヒドの分解が確認された。

1. はじめに

省エネルギー対策として建築物の高気密・高断熱化が進むとともに、品質が安定している新建材（合板、集成材、ボード等）が多く用いられるようになった。それに伴い、これらの新建材や家具等に用いられる塗料や接着剤から放散される揮発性有機化合物（VOC：Volatile Organic Compound）が室内において高濃度に存在するようになり、シックハウス症候群の原因物質として危惧されている。中でもホルムアルデヒドは刺激性が強い上に製品残留期間が長いため、住環境下における濃度の指針値が設けられており、ホルムアルデヒドを使わない製品の利用や室内環境からの除去が望まれている。これまでホルムアルデヒド除去法として、活性炭の様な吸着剤による方法や、光触媒により分解する方法等が開発され、一部で実用化されている。しかし、吸着剤は吸着したホルムアルデヒドが周囲環境の平衡濃度より高濃度になると再放出する。また、光触媒では目的以外の有機物質に対する触媒反応により別の汚染物質が発生（二次放散）¹⁾する可能性や光源を必要とする等、まだ十分とはいえない面もある。他

方、微生物及び酵素を利用した環境修復技術に関する研究が盛んである。この方法は、ホルムアルデヒドを分解することから再放出の問題がなく、利用する微生物や酵素によっては分解基質をある程度限定できるといった利点がある。そこで、本研究では、微生物及び酵素を用いたホルムアルデヒド分解技術の開発を目的として、自然界からホルムアルデヒド分解能力を有する微生物を探索した。さらに、取得した微生物を用いて、ホルムアルデヒドの分解に関する検討を行った。

2. 実験方法

2.1 菌の単離

表1に示した基本培地を単離に用いた。基本培地に1.5%の寒天を添加して平板培地とした。培地中に炭素源として1.0%メタノール、0.2%メチルアミン、または0.1%ホルムアルデヒドを含有する3種類の培地を使用した。なお、ホルムアルデヒドを含む培地のみグルコース濃度を1.0%とした。平板培地に土壌又は排水を塗抹し、30℃で約1週間培養後、生育してきた微生物を単離した。ホルムアルデヒドは、メタノールの混入を避けるためにパラホルムアルデヒドの溶解液を用いた。

*1 応用技術部, *2 材料部, *3 食品工業技術センター

表1 培地組成

グルコース	0.01g or 1.0g
硝酸ナトリウム	0.2g
リン酸二カリウム	0.1g
硫酸マグネシウム七水和物	0.05g
塩化カリウム	0.05g
硫酸第一鉄七水和物	0.001g
酵母エキス	0.01g
クロラムフェニコール	0.01g
トライトン X-100	0.25ml
pH 6.0	100ml (イオン交換水)

2.2 ホルムアルデヒド分解の確認

0.1%ホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)に生菌体を加え、30℃で静置した。菌体投入直後及び約12時間のホルムアルデヒド濃度の減少を確認した。

2.3 ホルムアルデヒド耐性試験

基本培地5.0mlに0.1%ホルムアルデヒドを含む平板培地で培養した菌体を1白金耳植菌し、30℃で振とう培養を行った。植菌時の培地中ホルムアルデヒド濃度は0.10~0.60%とした。培養を約1週間行い、菌体増殖の有無及びホルムアルデヒド濃度の減少から菌のホルムアルデヒド耐性を調べた。

2.4 固定化菌体によるホルムアルデヒド分解

内径15mm、長さ60mmのガラス製カラムを0.129%ホルムアルデヒド溶液200mlの入ったガラス容器に接続し、ポンプでホルムアルデヒド溶液を循環させた(図1)。試験開始108時間後、カラムに0.234g(乾燥重量相当)の生菌体を添加、保持した。ホルムアルデヒド循環液を経時的にサンプリングし、ホルムアルデヒド濃度を定量した。

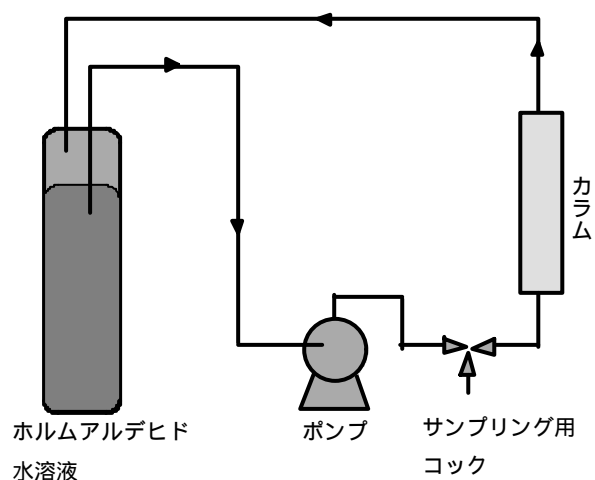


図1 分解試験装置図

2.5 ホルムアルデヒドの定量

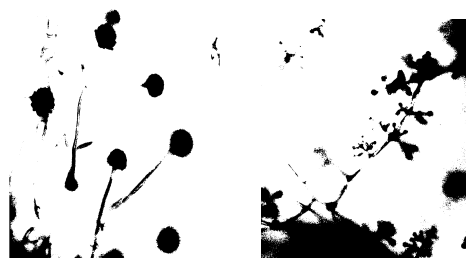
ホルムアルデヒドの定量にはNash法²⁾を用いた。すなわち、試料溶液に同量のアセチルアセトン溶液(酢酸アンモニウム150g、酢酸3ml及びアセチルアセトン2mlを蒸留水で1000mlとした)を加え、60℃で10分間反応させた。冷却後、生成したDDL(3,5-ジアセチル-1,4-ジヒドロルチジン)の黄色発色を415nmの吸光度で測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 ホルムアルデヒド分解微生物のスクリーニング

170カ所のサンプルからホルムアルデヒドに対する耐性を有するカビ9株(IRI001、IRI004、IRI007、IRI008、IRI009、IRI013、IRI016、IRI017、IRI020)を得た。これらのカビは全て、0.1%のホルムアルデヒドを含む培地から取得された。形態観察により菌種の同定を行ったところ、IRI001、IRI004、IRI009、IRI013及びIRI020はAspergillus属、IRI007、及びIRI008はBotrytis属、IRI016及びIRI017株はPaecilomyces属であると同定した³⁾⁴⁾⁵⁾(写真1)。

a. Aspergillus sp. b. Botrytis sp.



c. Paecilomyces sp.



写真1 取得微生物の顕微鏡写真

また、全ての株が0.30%以上のホルムアルデヒドを含む培地で良好に生育し、0.45~0.50%の高濃度ホルムアルデヒドを含む培地で生育するカビも存在した(表2)。これらのカビは、これまでにホルムアルデヒド分解能力を有するとの報告があったカビ⁶⁾⁷⁾とは異なる属であり、既報のカビより十分に高いホルムアルデヒド濃度の環境下で生育が可能であることが明らかとな

表2 ホルムアルデヒドのカビの増殖に対する影響

株	属	ホルムアルデヒド* (%)
IRI001	<i>Aspergillus</i>	0.35
IRI004	<i>Aspergillus</i>	0.30
IRI007	<i>Botrytis</i>	0.45
IRI008	<i>Botrytis</i>	0.35
IRI009	<i>Aspergillus</i>	0.40
IRI013	<i>Aspergillus</i>	0.45
IRI016	<i>Paecilomyces</i>	0.40
IRI017	<i>Paecilomyces</i>	0.50
IRI020	<i>Aspergillus</i>	0.45

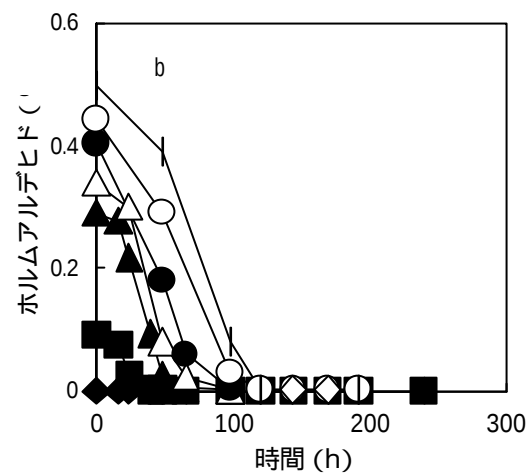
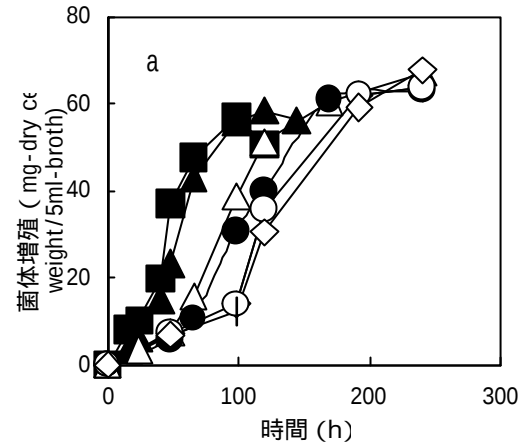
培養は 30℃ で行った

*カビの増殖がしたホルムアルデヒドの最大濃度

った。これらカビの高いホルムアルデヒド耐性能力は既報の微生物において高いホルムアルデヒド耐性能力を有するとされている酵母⁸⁾(0.55%)の能力と遜色のないものであり、リアクタ等に用いてホルムアルデヒド分解に利用することに適していると考えられた。これらカビを 0.1%のホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液中に入れたところ、約 12 時間後に液中のホルムアルデヒドの減少が確認された。これらのカビはホルムアルデヒド耐性を有するのみならず、菌体レベルで水溶液中のホルムアルデヒドの分解を行っていることを確認した。

3.2 培養中のホルムアルデヒドの消長及び分解試験

0.2%のホルムアルデヒドを含む平板培地で前培養した IRI017 株を様々な濃度のホルムアルデヒドを含む基本培地に接種し培養を行った(図2)。初発ホルムアルデヒド濃度が高くなるにつれ増殖は遅れるものの、0.5%のホルムアルデヒド存在下でも増殖した。また、高濃度のホルムアルデヒドを添加した培地においてはホルムアルデヒド濃度がほぼ 0.1%に減少した後に増殖速度が大きくなる傾向が見られた。このことから、ホルムアルデヒドが高濃度の環境においては、ホルムアルデヒド分解に関する酵素は優先的に発現し、ホルムアルデヒド分解が行われ、ホルムアルデヒド濃度の低下により菌が増殖すると考えられた。定常期における菌体量は初発ホルムアルデヒド濃度に関係なく、ほぼ一定であった。ホルムアルデヒドを含まない培地で前培養を行った菌を用いたところ、0.5%のホルムアルデヒドを含む培地では菌体の増殖はみられなかった。これらのことから、ホルムアルデヒド分解に関する酵素は培地基質により誘導的に発現すると考えられ、培養条件の検討等によりさらに分解効率の向上が図れる



(a)菌体増殖の経時変化

(b)ホルムアルデヒド濃度の経時変化

初期ホルムアルデヒド濃度(%):

0.0 (○), 0.10 (■), 0.30 (▲), 0.35 (◇),
0.40 (●), 0.45 (○), 0.50 (◇)

図2 IRI017の培養経過

ものと考えられた。

次に、休止菌体によるホルムアルデヒド分解の可能性について検討した。ホルムアルデヒドを 0.129%含む溶液を空カラム内に循環させ、開始 108 時間後にカラムに IRI017 株の菌体を投入したところ、40 時間後(試験開始 148 時間後)、ホルムアルデヒドが約 27%減少した(表3)。このことから、休止菌体レベルでもホルムアルデヒド分解が可能であり、今後ホルムアルデヒド分解を目的としたリアクタ等を構築できることを確認した。今後ホルムアルデヒドの分解速度を上げるために、使用する菌体量や固定化方法等菌体の利用及び酵素の利用方法についての検討を行う。

表3 固定化IRI017菌体による液中ホルムアルデヒド濃度の変化

反応時間(h)	0	50	108(0)	120(12)	128(20)	148(40)
ホルムアルデヒド(%)	0.129	0.128	0.126	0.116	0.105	0.092

IRI017 は 108 時間後にカラムに投入した。カッコ内の数字は IRI017 投入後の時間(h)を示す。

4. 結 び

ホルムアルデヒドの様なC1化合物の分解酵素を持つ微生物として、バクテリア⁸⁾⁹⁾やCandidaなどの酵母¹⁰⁾がよく知られているが、カビについてはあまり知られていない。今回取得したカビはホルムアルデヒドに対し高い耐性を有しており、休止菌体を用いた試験においても、菌体レベルでのホルムアルデヒドの分解が確認された。ホルムアルデヒドは、室内環境のみならず、医療業界や繊維業界の排水中に含まれその処理が望まれる。この菌の性質は、これらホルムアルデヒド分解への利用に十分な可能性があると思われることから、固定化剤や菌体・酵素の利用方法等の検討を行い、分解効率の向上を図る予定である。

参考文献

- 1) P. Wolkoff et.al, : Atmospheric Environment, 33, 693(1999).
- 2) T. Nash : Biochem. J., 55, 416(1953).
- 3) 宇田川俊一ほか：菌類図鑑, 834(1978), 講談社.
- 4) 原口隆英ほか：防菌防黴ハンドブック, 1130(1986), 技報堂出版.
- 5) 小島貞男ほか：環境微生物図鑑, 104(1995), 講談社サイエンティフィック.
- 6) 特開平 11-19685
- 7) 特開平 11-19686
- 8) O. Adachi, K. Matsushita, E. Shinagawa and M. Ameyama: Agric. Biol. Chem., 54, 3123(1990).
- 9) 駒形和夫：微生物の機能開発 バイオ研究の最前線, (1992), 学会出版センター.
- 10) N. Kato, N. Miyakawa and C. Sakazawa : Agric. Biol. Chem., 46, 655(1982).