

酵素含有高分子フィルム（酵素フィルム）

菅 駿 輔*・榊 秀次郎

The phospholipid polymer film containing enzyme (Enzyme film)

Shunsuke SUGA* and Shujiro Sakaki

(平成25年12月16日受理)

A poly(2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine-co-butylmethacrylate) (PMB) have functions of high water absorbency, high moisture keeping, high moisture content and easy film formation. And an enzyme film containing of PMB, formaldehyde dehydrogenase (FDH) and its coenzyme NAD+ can decompose or convert atmospheric formaldehyde into alcohol. However, the mechanism of the decomposed process in the enzyme film has not been investigated in detail. So, a purpose of this study is clarifying a decomposed process in the enzyme film. The decompose process of atmospheric formaldehyde by FDH is following of three processes; (1) shift process (formaldehyde shifts into film), (2) combine process (formaldehyde combines with FDH), and (3) decompose process (FDH decomposes formaldehyde). We understood that the processes of atmospheric formaldehyde decomposed didn't depend on the humidity. From these results, we concluded that decomposed process is rate-determining step.

1. 緒 言

シックハウス症候群は、住宅の高気密化や高断熱化により、建材・内装材から放散するホルムアルデヒド等の化学物質が原因で、頭痛や吐き気、めまい、集中力の低下等の健康障害を起こす病気である¹⁾。特に、ホルムアルデヒドは建材や内装材の接着剤や塗料に含まれるフェノール樹脂やメラミン樹脂などを重縮合する際に必須であり、この病気の対策として換気をこまめに行うことが挙げられ、ホルムアルデヒドをなくするという根本的な対策は知られていない。

一方で、ポリマーアロイは、合成高分子に対して新しい機能を付加する手法として知られている²⁾。例えば、対衝撃性ポリスチレン (High Impact Poly Styrene: HIPS) は、硬く割れやすいが成型しやすいポリスチレンに対して柔らかいが成型しにくいポリブタジエンを混合することで、割れにくくしなやかな特性を発現させている。しかしながら、ポリマーアロイは合成高分子に対して合成高分子を混合したものであり、合成高分子に生体高分子である酵素を混合することは、その複合化方法が複雑であることや、合成高分子と比較すると、複合材料のフィルム化や繊維化が困難であり、実用化されていない。

*環境システム工学専攻

既に、水溶性、吸保湿性及び自由水含量が高い 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) (図 1)³⁾ と butylmethacrylate: (BMA) の共重合体でその組成比が 0.3 : 0.7 (mol/mol) である PMB37³⁾ と、ホルムアルデヒド分解酵素である formaldehyde dehydrogenase (FDH) を混合し、キャスト法にてフィルム化した酵素含有高分子フィルム (酵素フィルム) を用いることで、気相中のホルムアルデヒド量を減少させることは知られている⁴⁾。

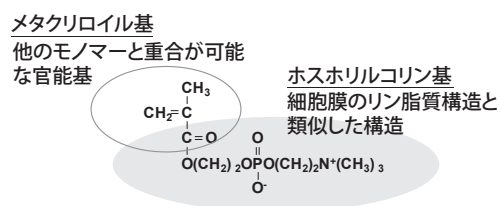


図 1 .MPC の構造式

しかしながら、酵素フィルムを用いた気相中のホルムアルデヒド分解過程の作用機序については、ほとんど解明されていない。そこで本研究では、まずは下記の①～④についての検討を行い、最終的には、酵素フィルムによる気相中ホルムアルデヒド分解過程の作用機序解明を目的とした。

- ① ホルムアルデヒド減少が酵素反応（酵素分解）によることの確認
- ② 酵素フィルムの湿度への依存性
- ③ PMB37 と他の水溶性ポリマーの比較
- ④ PMB37 とポリエチレングリコールの比較

2. 実験

2-1. ホルムアルデヒド減少が酵素反応(酵素分解)によることの確認

FDH は補酵素を必要とする酵素であり、補酵素である Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) 等と結合して酵素反応を起こすが、補酵素と結合していない酵素（アポ酵素）は基質と結合はするが酵素反応を起こすことができない特性を持つ^{5,6)}。

そこで、このことを利用し、下記3つの量を測定し（図2）、フィルム中の FDH によって気相中のホルムアルデヒド量が酵素分解されていることを明らかにすることを目的とした。

- ホルムアルデヒドがフィルムに移行した量
- ホルムアルデヒドがフィルムに移行した量 & FDH と結合した量
- ホルムアルデヒドがフィルムに移行する量 & FDH と結合した量 & 酵素分解された量



図2. フィルム中における酵素反応モデル

<方 法>

11.0 mg ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ (FDH) (東洋紡績株式会社製) に 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) (10 mM NaPB) 110 μ L を加えて、溶解し FDH 溶液を調製した。3.15 mL 5.0 wt% MPC/BMA 共重合体水溶液 (MPC/BMA = 0.3/0.7, mol/mol) (PMB37) (日油株式会社) (図3) に 350 μ L 100 mM NaPB を加え、PMB37 溶液を調製した。

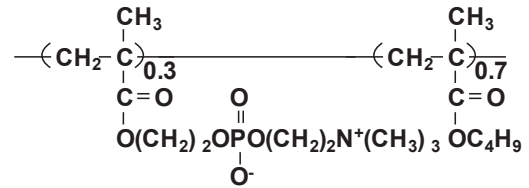


図3. PMB37 の構造式

直径 10 cm ガラスシャーレ各々下記の溶液を添加した。尚、液量を一定にするために、FDH 未添加, 0.01 M NAD 未添加時には添加時と同量の 10mM NaPB を添加した。

- ① PMB37 フィルム : 3.3 mL PMB37
- ② PMB37/FDH フィルム : 3.3 mL PMB37, 110 μ L FDH
- ③ PMB37/FDH/NAD フィルム : 3.3 mL PMB37, 110 μ L FDH, 1.1 mL 0.01 M NAD

添加後、室温で 17 時間乾燥して各酵素フィルムを調製した。

調製した酵素フィルムを各々デシケーターの下部に設置した。電熱器で 50 mL ビーカーを 5 分間熱し、素早くデシケーター内に設置し上部から 18.5 % ホルマリン 20 μ L を滴下し、素早く蓋を閉めて密閉しホルムアルデヒドを充満させた。0, 4, 24 時間後に、デシケーターに気体検知管にて、残存ホルムアルデヒド量をそれぞれ測定した（図4）。

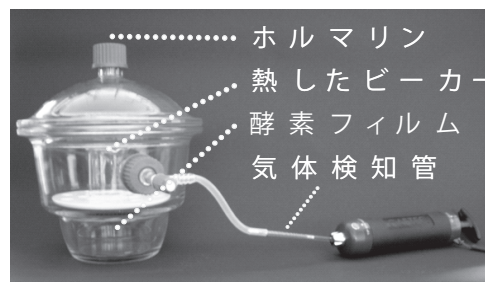


図4. 残存ホルムアルデヒド量測定システム

酵素含有高分子フィルム（酵素フィルム）

＜結果・考察＞

各フィルムは全て透明でなめらかなフィルムになっていることを目視で確認した。
各フィルムの残存ホルムアルデヒド量を図5に示した。

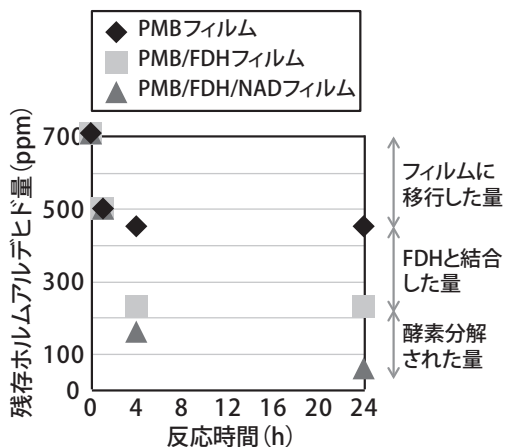


図5. 各時間における残存ホルムアルデヒド量

各フィルムの残存ホルムアルデヒド量を比較すると、①PMBフィルム < ②PMB/FDHフィルム < ③PMB/FDH/NADフィルム となった。

以上の結果より、酵素フィルムによる気相中のホルムアルデヒド分解過程は、

- (I) ホルムアルデヒドが移行する移行過程
- (II) ホルムアルデヒドがFDHと結合する結合過程
- (III) FDHにより酵素分解される分解過程

の3過程によること、つまり気相中のホルムアルデヒド量の減少は酵素反応（酵素分解）によることが確認された。

2-2. 酵素フィルムの湿度への依存性

＜方法＞

2-1の③PMB37/FDH/NADフィルムと同様に各溶液を混合し、恒温恒湿器内（25℃/30, 60, 90%RH）で各々17時間乾燥させ、酵素フィルムを調製した。

各フィルムを2-1と同様にホルムアルデヒドを充満させ、恒温恒湿（25℃/30, 60, 90%RH）・各時間（0, 4, 8, 24時間）後に、残存ホルムアルデヒド量をそれぞれ測定した。

＜結果・考察＞

各フィルムは、湿度による違いがほとんど無く、全て透明でなめらかなフィルムになっていることを目視で確認した。

各フィルムの残存ホルムアルデヒド量を図6に示した。

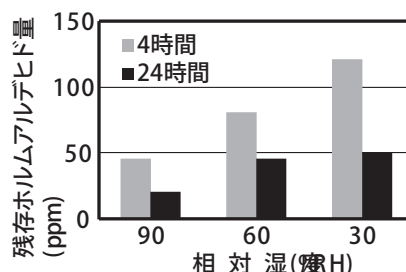


図6. 各湿度における残存ホルムアルデヒド量

4時間後の残存ホルムアルデヒド量を比較すると、湿度が高くなるとより多くのホルムアルデヒドが分解されていることがわかった。また24時間後の残存ホルムアルデヒド量を比較すると、全て50 ppm以下であったが、60%RHと90%RHを比較すると、より湿度が高い90%RHの方がより多くのホルムアルデヒドが分解されていることがわかった。

以上の結果より、酵素フィルムの分解能は湿度に依存していることがわかった。

2-3. PMB37と他の水溶性ポリマーの比較

＜方法＞

2-1の③PMB37/FDH/NADフィルムのPMB37の代わりに他のポリマーとして、ポリビニルアルコール（PVA）（キシダ化学株式会社, M.W.=22,000）、ポリエチレングリコール（PEG）（キシダ化学株式会社, M.W.=7,400～9,000）、ポリビニルピロリドン（PVP）（キシダ化学株式会社, M.W.=40,000）、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）単独重合体（PMPC）（日油株式会社製）及び、MPC/BMA共重合体（MPC/BMA = 0.8/0.2, mol/mol）（PMB82）（日油株式会社製）（図7）を使用した。

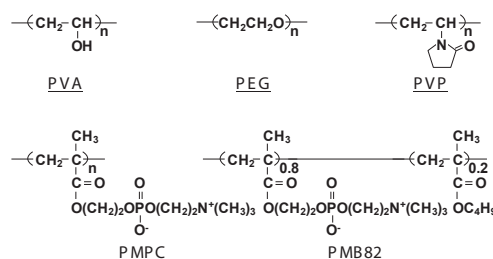


図7 他の水溶性ポリマーの構造式

恒温恒湿器 (25℃ / 30, 60, 90%RH) で 17 時間乾燥させ、各ポリマー酵素フィルムを調製した。調製後、各ポリマーフィルムを 2-1 と同様にホルムアルデヒドを充満させ、恒温恒湿 (25℃ / 30, 60, 90%RH / 0, 4, 8, 24 時間) 後に、残存ホルムアルデヒド量をそれぞれ測定した。

<結果・考察>

各フィルムは、湿度による違いがほとんどなかった。PVP を用いたフィルムは表面が滑らかではなく少し白濁していたが、それ以外のポリマーは全て透明でなめらかなフィルムになっていることを目視で確認した。各フィルムの残存ホルムアルデヒド量を図8に示した。

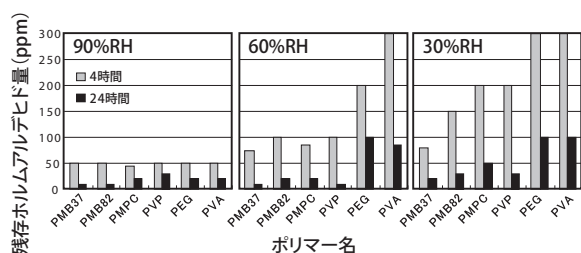


図8. 各ポリマーにおける残存ホルムアルデヒド量

90%RH では使用したポリマーに関わらず、全ての酵素フィルムで 50 ppm 以下に分解することができた。一方、60%RH では 90%RH と比較すると、PEG 及び、PVA の分解能は低くなった。更に、30%RH では PMB37 は 4 時間で 75 ppm まで分解することができ、PMB82 は 150 ppm、PMPC 及び、PVP は 200 ppm まで分解でき、PEG 及び、PVA は 300 ppm までしか分解できなかった。

以上の結果より、使用したポリマーに関わらず、湿度が高いと全ての酵素フィルムでホルムアルデヒドを分解することができることがわかった。また、他の水溶性ポリマーと比較すると、PMB37 酵素フィルムは、湿度が低くてもホルムアルデヒドを分解できることがわかった。

2-4. PMB37 とポリエチレングリコールの比較 1 (含水率測定)

<方法>

直径 10 cm ガラスシャーレを精秤し (W1)、各々 3.3 mL PMB37 水溶液及び、3.3 mL PEG 水溶液、1.21 mL 10 m M NaPB を添加し精秤した (W2)。恒温恒湿器内 (25℃ / 30, 60, 90%RH) で 17 時間乾燥させ、フィルムを調製した。調製したフィルムを精秤した (W3) 後、110℃ / 4 時間乾燥させ精秤した

(W4)。

各精秤結果 (W1, W2, W3, W4) 及び、下式 (1) よりフィルムの含水率を求めた。

$$\text{含水率 (\%)} = \frac{W3-W4}{W3-W1} \times 100 \dots (式1)$$

<結果・考察>

各フィルムの含水率の結果を表3に示した。

表3. PMB37 及び、PEG フィルムの含水率

フィルム名	相対湿度		
	90%RH	60%RH	30%RH
PMB37 フィルム	36.6%	31.5	25.7%
PEG フィルム	55.7%	40.8	27.0%

以上の結果より、全ての湿度で PMB37 フィルムよりも PEG フィルムの含水率が高いことがわかった。

2-5. PMB37 とポリエチレングリコールの比較 2 (含水率測定)

<方法>

2-1 と同様に 5.0 wt% PMB37 水溶液及び、5.0 wt% PEG 水溶液を用いて下記①~⑥のフィルムを調製した。

尚、液量を一定にするために、FDH 未添加, 0.01 M NAD 未添加時には添加時と同量の 10mM NaPB を添加した。

- ① PMB37 フィルム : 3.3 mL PMB37
- ② PMB37/FDH フィルム : 3.3 mL PMB37, 110 μ L FDH
- ③ PMB37/FDH/NAD フィルム : 3.3 mL PMB37, 110 μ L FDH, 1.1 mL 0.01 M NAD
- ④ PEG フィルム : 3.3 mL PEG
- ⑤ PEG/FDH フィルム : 3.3 mL PEG, 110 μ L FDH
- ⑥ PEG/FDH/NAD フィルム : 3.3 mL PEG, 110 μ L FDH, 1.1 mL 0.01 M NAD

調製後、各ポリマーフィルムを 2-1 と同様にホルムアルデヒドを充満させ、恒温恒湿 (25℃ / 30, 60,

90%RH / 0, 4, 8, 24 時間) 後に、残存ホルムアルデヒド量をそれぞれ測定した。

＜結果・考察＞

PMB37 の表面は滑らかであったが、PEG を用いたフィルムは全体に少し白濁しているフィルムであった。しかしながら、調製時の湿度による差はほとんど見られなかった。

各フィルムの残存ホルムアルデヒド量を図9に示した。

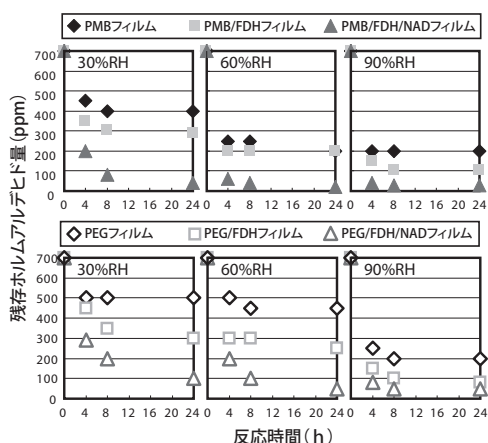


図9. 各ポリマーにおける残存ホルムアルデヒド量

「ホルムアルデヒドがフィルムに移行した量」を比較すると、全ての時間・湿度において、PMB37 は PEG よりも多かった。また、「ホルムアルデヒドがフィルムに移行した量 + FDH と結合した量」を比較すると、若干の差はあるが全ての時間・湿度において、PMB37 と PEG はほぼ同じであった。更に、「ホルムアルデヒドがフィルムに移行した量 + FDH と結合した量 + 酵素分解された量」を比較すると、全ての時間・湿度において、PMB37 は PEG よりも多かった。

以上の結果より、PMB37 を用いた酵素フィルムは、PEG を用いた酵素フィルムよりも酵素のターンオーバー数が多く、より多く酵素反応が進行していることがわかった。これは、PMB37 は PEG よりもフィルム中の自由水含量が高く、酵素の自由度が高いため、低湿度（低含水率）でもよりホルムアルデヒドを分解できたと思われる。

3. まとめ・

ホルムアルデヒド減少が酵素反応（酵素分解）によることの確認

酵素フィルムによる気相中のホルムアルデヒド分解過程は、以下の（I）～（III）の過程で酵素分解され

ていることがわかった。

- （I）ホルムアルデヒドが移行する移行過程
- （II）ホルムアルデヒドが FDH と結合する結合過程
- （III）FDH により酵素分解される分解過程

酵素フィルムの湿度への依存性

酵素フィルムの分解能は湿度に依存していることがわかった。

PMB37 と他の水溶性ポリマーの比較

使用したポリマー（PVA, PEG, PVP, PMPC, PMB82）に関わらず、湿度が高いと全ての酵素フィルムでホルムアルデヒドを分解することができることがわかった。また、他の水溶性ポリマーと比較すると、PMB37 酵素フィルムは、湿度が低くてもホルムアルデヒドを分解できることがわかった。

PMB37 とポリエチレングリコールの比較 1（含水率測定）

全ての湿度（30, 60, 90%RH）で PMB37 フィルムよりも PEG フィルムの含水率が高いことがわかった。

2 - 5. PMB37 とポリエチレングリコールの比較 2（含水率測定）

PMB37 を用いた酵素フィルムは、PEG を用いた酵素フィルムよりも酵素のターンオーバー数が多く、より多く酵素反応が進行していることがわかった。

以上の結果より、酵素フィルムの分解能は、フィルムの含水率には依存せず、フィルム中の自由水含量に依存してい、つまりフィルム中の自由水含量が高いと、酵素の反応性が高くなり、低湿度（低含水率）でもより多くのホルムアルデヒドを分解できたと思われる

4. 参考文献

- 1) 辻原万規彦, 今村仁美, 田中美都, 図説 やさしい建築環境, 学芸出版社, 2009, p.93-94
- 2) 井上隆, 市原祥次, ポリマーアロイ, 共立出版株式会社, 1988, p.1-6
- 3) 石原一彦. 先端医療を支える新素材 MPC ポリマー. MMJ.2010, Vol.6, No2, p.68-70.
- 4) Naoki TANAKA,; Akihiro WATARI,; Tomoko TADA,; Tomoko ASADA,; Shigeru KUNUGI,; Yin-Fai Lee,; Satoshi YAMADA,; Kenshiro SHUTO,; Shujiro SAKAKI. APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 2009, VOL.1, NO.2, 228-231
- 5) 田中渥夫, 松野隆一. 酵素工学概論, コロナ社, 1995, p.3-4.
- 6) 船津勝編. 酵素, 講談社, 1976, p.10-20.