

## プロジェクト 2

### 酵素反応を利用したフェノール化合物の吸着除去

山田 和典・平田 光男 (応用分子化学科)

#### 1 緒論

フェノールとその誘導体(以下、称してフェノール系化合物)は製鉄、石油精製、化学薬品、繊維、染料、パルプ工場など多くの工業廃水に含まれる化合物である。その中で塩素置換体、アルキル置換体などは毒性が高いだけでなく生分解しにくいいため、一般の廃水処理で行われている活性汚泥などの微生物処理では分解されないなど、その処理法に問題点も多い。そこで、フェノール系化合物を効率的に酸化することができる酵素を用いた生化学的な処理の研究が近年行われ始めている。フェノール系化合物は酵素触媒により不安定な中間体であるキノン化合物に変換され、ペルオキシダーゼ、クロロペルオキシダーゼ、チロシナーゼ、ラッカーゼなどの酵素が多くの研究で用いられている中で[1], より安価な酵素を利用したプロセスの開発が待たれている。

酵素は生体内で様々な物質と相互作用することによって酵素反応に代表される機能を発現する。

マッシュルーム(ツクリタケ, *Agaricus bisporus*) から取れるチロシナーゼ (tyrosinase, polyphenol oxidase, EC 1.14.18.1) はアミノ酸の一種であるチロシンの酸化反応を触媒し, L-dopa(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-dopa)の生成を経てメラミン様色素の生成に関与する。また, チロシナーゼは多くのフェノール系化合物を酸化し, 褐色の色素を生成する。フェノールを含む多くのフェノール系化合物をキノン酸化させることが近年の研究で明らかとなっており, 酸化剤として溶存酸素を利用できる点でペルオキシダーゼとは異なる。

また, 酵素酸化によって生成したキノン化合物はシッフ塩基反応を介してアミノ基と結合することが知られており, キトサンやポリエチレンイミンなどのアミノ基含有高分子が吸着(凝集)剤として使われているが, 反応系に溶液としてこれらの高分子を加える場合, 凝集作用に適した濃度範囲があり, 高濃度の添加は凝集効果を低下させる。

キトサンは, N-アセチル-D-グルコサミンが $\beta(1-4)$ 結合した直鎖状の多糖類であるキチンを脱アセチル化することによって得られ, 年生産量は全世界で  $10^{10}$  トンにも達する。1977年に水産加工場から廃棄されるカニ殻キチンからのキトサンの工業生産が始まり, 天然金属イオン凝集剤が開発され, キトサン応用の第一号となった。しかし, キトサンの十分な有効利用に関しては開発段階であるのが, 現状である。

本研究では, *p*-及び *m*-クレゾールを基質としてチロシナーゼによるキノンへの酸化とキトサンによるキノンの吸着を複合させた除去システムの構築を目指して, 酵素濃度, 温度, pH 依存性からフェノール系化合物の吸着除去の最適条件を評価するとともにアルキル及びハロゲン化フェノール類への応用も検討した。

#### 2 実験

##### 2.1 試料

チロシナーゼ(マッシュルーム由来, 2,590U/mg-solid)は Sigma 社から購入した。フェノール系化合物は和光純薬と東京化成工業から購入し, 市販品をそのまま使用した。キトサンは和光純薬製の chitosan1000 を用いた。pH 2~3 の塩酸に溶解させた濃

Adsorption and Removal of Phenolic Compounds by Use of Enzymatic Reaction

Kazunori YAMADA and Mitsuo HIRATA

度 1 w/v% のキトサン溶液 2 cm<sup>3</sup> を直径 3.2cm のシャーレに展開した後、60°C の乾燥器中で乾燥させた。シャーレから剥離したキトサンフィルムは 1 M の NaOH で洗浄した後、減圧乾燥させた。多孔質キトサンビーズ(キトパール AL-01, 富士紡績製)は所定の pH の緩衝溶液中で平衡膨潤させた後、実験に使用した。

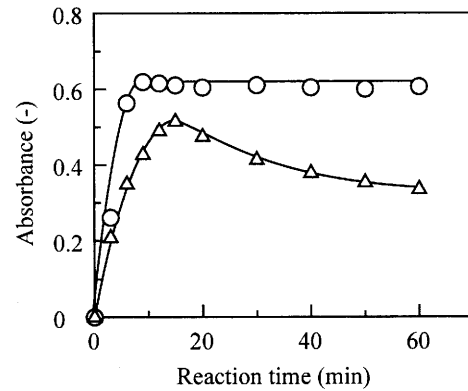
## 2. 2 酵素反応

pH7.0 でチロシナーゼ緩衝溶液と 1.0mM の基質(フェノール系化合物)緩衝溶液を 45°C で混合することで反応を開始させ、所定時間ごとに UV スペクトルを測定した。基質+チロシナーゼ混合緩衝溶液中に浸漬したキトサンフィルムは純水で洗浄、減圧乾燥した後、UV スペクトルを測定した。

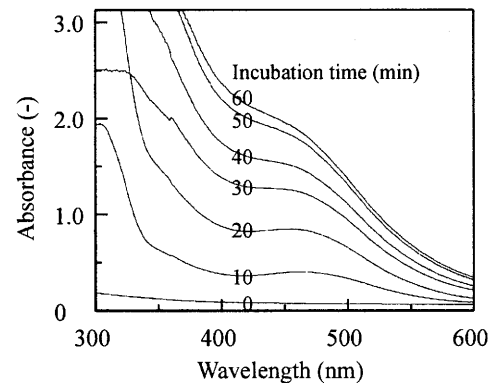
## 3 結果及び考察

### 3. 1 クレゾールに対する酵素反応と吸着

pH7.0, 45°C でチロシナーゼ+p-クレゾール混合溶液にキトサンフィルムを浸漬させた場合とさせなかった場合の溶液の波長 400nm での吸光度の経時変化を図 1 に示す。キトサンが浸漬していない混合溶液の吸光度は上昇した後、約 10 分で一定となったのに対し、キトサンフィルムを浸漬させると、15 分以降で吸光度が徐々に低下した。チロシナーゼ+p-クレゾール混合溶液に浸漬したキトサンフィルムの UV スペクトルを図 2 に示す。浸漬時間の経過に伴って波長 460nm のピークが増大するのがわかる。このピークはキトサン中のアミノ基にシッフ塩基やミハエル付加反応によって結合したキノン化合物に帰属するピークであり、図 1 に示した混合溶液のピークの低下と併せて酵素反応によって生成したキノン化合物がキトサンフィルムに吸着されることがわかった。そこで、1.0mM の p-及び m-クレゾールに対して酵素濃度、温度、pH などの最適条件を検討した。その結果、最適温度と pH はいずれも 45°C, pH7.0 であったが、最適酵素濃度は p-クレゾールでは 0.02mg/cm<sup>3</sup>, m-クレゾールでは 0.03mg/cm<sup>3</sup> となった。従って、45°C, pH7.0



**Figure 1** Changes in the absorbance at 400 nm of a mixture buffer containing *p*-cresol and tyrosinase with (△) and without (○) a chitosan film with the reaction time at pH 7.0 and 45 °C. Concentration of *p*-cresol = 0.5 mM. Concentration of tyrosinase = 0.020 mg/cm<sup>3</sup>.



**Figure 2** Changes in the UV spectra of the chitosan films incubated in a mixture buffer containing *p*-cresol and tyrosinase with the reaction time at pH 7.0 and 45 °C. Concentration of *p*-cresol = 0.5 mM. Concentration of tyrosinase = 0.020 mg/cm<sup>3</sup>.

でキトサンビーズへの吸着や他のフェノール系化合物のキノン酸化を検討した。

### 3. 2 アルキルフェノールに対する酵素反応と吸着

アルキルフェノールの中で 4-*tert*-ブチルフェノール(4TBP)は直接チロシナーゼによってキノン酸化を受けないが、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を混合系に加えると酵素反応が進行することが知られているので[2], 4TBP に対する吸着除去に対して pH, 温度, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度依存性から吸着の最適条件を検討した。

4TBP 濃度を 0.5mM, チロシナーゼ濃度を 0.02 mg/cm<sup>3</sup> として pH と温度の最適条件を検討した結果、pH6.0 で 4TBP のキノン

酸化とキトサンへの吸着が最も顕著に起こった。温度依存性に関してはキノン生成の経時変化は 35~45°C で顕著なキノン酸化が起きたが、55°C ではほとんど酵素反応を示さなかった。また、キトサンフィルムへの吸着は 45°C 以下で温度上昇とともに向上したので、pH6.0, 45°C で吸着の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度依存性を評価した。その結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 0.5mM で最も効率よくキノン化合物が生成し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が高すぎると生成したキノン化合物の水和反応が起こるため、キトサンへの吸着は逆に低下した。

これに対して、4-エチルフェノール(4EP), 4-n-プロピルフェノール(4NPP), 4-n-ブチルフェノール(4NBP)などのアルキルフェノールは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加することなく酵素反応が進行するので、p-クレゾールに対して決定した最適条件(pH7.0, 45°C)でキトサンフィルムを浸漬させた場合とさせなかった場合で酵素反応を行った。いずれもアルキルフェノールに対しても波長 460nm のピークは浸漬時間とともに上昇し、p-クレゾールに対して決定した最適条件で酵素反応とキトサンへの吸着が起こることが解った。

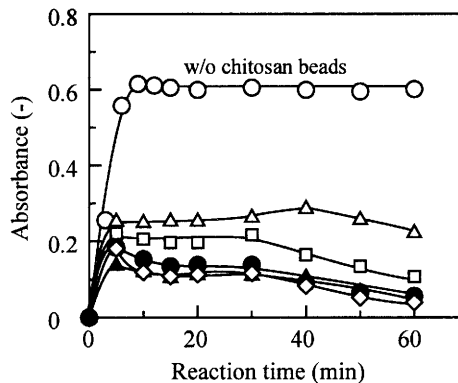
### 3. 3 キトサンビーズへの吸着

pH7.0 で温度を 25, 35, 45°C と変化させて p-クレゾールを基質として酵素反応を開始した際の結果を表 1 に示す。反応温度に対してキノン生成量はほぼ同じであるが、キノン生成量が一定となる時間は温度が上昇するにつれて短縮され、温度が高いほどキノン生成速度が速いことがわかってきた。また、p-クレゾールに対して決定した最適条件で酵素反応とキトサンへの吸着が起こることが解った。

**Table 1** Temperature dependence of adsorptive removal of p-cresol with chitosan beads

Temp. (°C)	Time <sup>1)</sup> (min)	Max. Abs.	Removal %
25	30	0.607	86.2
35	20	0.599	92.1
45	9	0.601	93.4

1)The reaction time required to reach the maximum absorbance at 400 nm.



**Figure 3** Changes in the absorbance at 400 nm in a mixture buffer containing p-cresol and tyrosinase with the chitosan beads of 0.2 ( $\Delta$ ), 0.5 ( $\square$ ), 1.0 ( $\diamond$ ), 1.5 ( $\bullet$ ), and 2.0 ( $\blacktriangle$ ) cm<sup>3</sup> with the reaction time at pH 7.0 and 45°C. Concentration of p-cresol = 0.5 mM. Concentration of tyrosinase = 0.020 mg/cm<sup>3</sup>.

ほどキノン生成速度が速いことがわかった。また、1.0cm<sup>3</sup>のキトサンビーズを添加させると、温度が高いほど吸着量が上昇し、45°C では 93%まで上昇した。この結果をもとに、pH7.0, 45°C でキトサンビーズの添加量依存性を検討した。チロシナーゼ + p-クレゾール混合溶液にキトサンビーズを 0.2~2.0cm<sup>3</sup> 添加した際の波長 400nm での吸光度の経時変化を図 3 に示す。波長 400nm での吸光度は酵素反応開始後 5 分まで上昇し、その後緩やかに低下した。また、キトサンビーズの添加量が多いほど混合溶液の吸光度は低下したが、添加量 1.0cm<sup>3</sup> 以上では吸光度の減少傾向に差が見られなくなったので、p-クレゾールの吸着除去に対するキトサンビーズの最適添加量を 1.0cm<sup>3</sup> とした。

さらに、m-クレゾール、上述したアルキルフェノール、カテコール、p-及び m-クロロフェノールにおけるキトサンビーズへの吸着性を pH7.0, 45°C(4TBP では pH6.0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 : 0.5mM)で行い、その結果を表 2 にまとめた。p-クレゾールを基質として際、キトサンビーズ添加量の増加とともに吸着量も増加し、表 2 に示す結果からその最適量を 1.0cm<sup>3</sup> とした。他のフェノール系化合物に対してもキトサンビーズ 1.0cm<sup>3</sup> を加えることによって 90%以上の除去率が得られ、効率よくフェノール系化合物を除去できることがわかった。また、4 TBP

**Table 2** Removal of phenolic compounds in the buffers containing tyrosinase and chitosan beads.

Substrate	Wavelength (mM)	Time (min)	Max. Abs. (nm)	Bead volume	Removal % (cm <sup>3</sup> )
<i>p</i> -cresol	400	9	0.614	0.2	63.2
				0.5	82.2
				1.0	93.4
				2.0	92.0
<i>m</i> -cresol	400	45	0.571	0.2	49.8
				1.0	86.8
				2.0	94.8
4-ethylphenol (4EP)	400	15	0.660	1.0	95.4
4- <i>n</i> -propylphenol (4NPP)	400	20	0.584	1.0	94.2
4- <i>n</i> -butylphenol (4NBP)	400	20	0.573	1.0	98.4
4- <i>tert</i> -butylphenol (4TBP)	398	60	0.198	0.5	8.6
				1.0	25.9
				3.0	40.8
				5.0	56.8
catechol	386	60	0.943	1.0	100
<i>p</i> -chlorophenol	408	60	0.729	1.0	93.5
<i>m</i> -chlorophenol	410	60	0.153	1.0	93.5

Substrate concentration: 0.5 mM

The pH value for 4TBP is 6.0 and the others are 7.0.

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration for 4TBP is 0.5 mM.

においては H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下で起こる酵素反応が他のフェノール系化合物に比べ遅く除去率も低かったが、キトサンビーズ添加量を 5.0cm<sup>3</sup> まで増やすことで除去率を 55% 以上まで上げることができた。他の多くの研究では生成したキノン化合物の除去に対してフェノール化合物とチロシナーゼを含む反応系にキトサンやポリエチレンジアミンなどのアミノ基含有高分子の溶液を添加し、凝集効果によって除去する系が報告されているが[3]、これらの系ではアミノ基含有高分子溶液の添加量に最適範囲があり、添加量はその範囲よりも高いもしくは低いとほとんど凝集効果が得られないといった問題があるが、本研究で用いたキトサンビーズの添加では、キノン化合物の吸着は固液界面で起こるので、添加量の増加は吸着量の増加につながり、吸着後のビーズの除去も容易である。

これまで、フェノール系化合物のキノン酸化への研究は多く報告されているが、生成されたキノン化合物の吸着や除去に関する報告は比較的少なく、本研究ではキトサンビーズを用いた吸着効率の高い系を構築することができ[4]、今後は酵素添加量

の低下、吸着除去効率の向上などの検討を行う予定である。

#### 4 参考文献

1. N. Durán and E. Esposito, Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, *Appl. Catal.B: Environ.*, **28**, 83-99 (2000).
2. M. Jiménez, F. García-Carmona, Hydrogen peroxide-dependent 4-*t*-butylphenol hydroxylation by tyrosinase — a new catalytic activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33-39 (1996).
3. S. Wada, H. Ichikawa, and K. Tatsumi, Removal of Phenols and Aromatic Amines from Wastewater by a Combination Treatment with Tyrosinase and a Coagulant, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 304-9 (1995)
4. 山田和典, 平田光男, 秋葉勇志, キトサンビーズを用いたフェノール系化合物の吸着除去方法, 特願 2003-317368.