

酸化還元酵素チロシナーゼとペルオキシダーゼによる

水溶液からのフェノール系化合物の除去

日大生産工 ○山田和典・柏田 歩・松田清美・平田光男

1. 緒言

汚染物質の1つであるアルキルフェノールの石油精製、樹脂製造、製紙などの工場からの排出が懸念され、発ガン性のあるものもある(1)。また、非イオン界面活性剤であるアルキルフェノールエトキシレート(1)の分解生成物としてオクチルフェノールやノニルフェノールなどのアルキルフェノールも環境中に存在することが知られている。アルキルフェノールと同様に産業界で多く使われている化合物としてビスフェノールA(BPA)があり、エポキシ樹脂やポリカーボネート樹脂の製造原料として、また抗酸化剤、難燃剤、顕色剤などとしてその誘導体が繊維、染料、製紙産業などで使われている。アルキルフェノールやBPAは動物やヒトに対して内分泌系をかく乱する可能性がある、または疑われる化学物質とされており、鳥類の卵殻薄化、魚介類の雌化、免疫機能の低下などに影響があると言われている。また、これらの化合物は、環境中で分解されにくいいため、残留して食物連鎖によって水棲動物(魚類、両生類、哺乳類)に数千から数万倍に濃縮されることも指摘されている(2, 3)。

近年これらの化合物を分解する、または別の化学種に変換させる酵素が見出され、マッシュルームチロシナーゼが *p-n*-アルキルフェノールをキノン酸化すること(4, 5)や西洋ワサビペルオキシダーゼが過酸化水素存在下でアルキルフェノールをラジカル化すること(6, 7)がわかっており、酵素を使った効率的な環境汚染物質の除去を構築できると考えている。その中で、マッシュルームチロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールのキノン酸化と生成したキノン化合物のキトサンビーズとの反応を利用したこれら化合物の効率的な除去を見出した(4, 5)。

本年度は、①麴菌由来のチロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールのキノン酸化と生成したキノン化合物のキトサンビーズへの吸着を利用した除去(8)と②過酸化水素存在下で、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼによるBPAのフェノキシラジカル化とラジカルカップリング反応による不溶性オリゴマーの形成による沈殿除去(9)に関する研究を中心に行ってきたので、麴菌チ

ロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去と西洋ワサビペルオキシダーゼによるBPAとその誘導体の除去に関して報告する。

2. 実験

2. 1 麴菌チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去

麴菌チロシナーゼは月桂冠(株)において産生、粗精製されたものを使用し、その比活性は936と1170 U/mg-solidであった(10)。*p*-アルキルフェノールは和光純薬(株)または東京化成工業(株)から購入し、市販品をそのまま使用した。

pH6.0のリン酸緩衝溶液を溶媒として麴菌チロシナーゼと *p-n*-アルキルフェノールの溶液を調製した。*p-n*-アルキルフェノール溶液に麴菌チロシナーゼ溶液と予め緩衝溶液中に保存したキトサンビーズ(富士紡績(株)、粒径:70~200nm、比表面積:70~100m²/g)を加えて反応を開始させた。

まず、*p*-クレゾールを対象物質として本方法によって除去する際の至適pHと至適温度を決定し(8)、種々の *p*-アルキルフェノールの除去に応用させた。実験中は、所定時間ごとに波長300~600nmの範囲でUV-visibleスペクトルを測定し、逆相カラムInertsil ODS-2またはInertsil C8-3(5μm, 4.6mmi.d.×15cm)を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法によって溶液中の *p*-アルキルフェノール濃度を求めた。移動相としてアセトニトリル水溶液を用い、アルキル鎖長によってその組成を調節した。初期濃度と残留濃度からキノンへの転化率を求め、キトサンビーズを添加したときと添加していない両溶液系でのUV-visibleスペクトル測定から生成したキノンのキトサンビーズへの吸着率を求め、転化率と吸着率から除去率を算出した。

2. 2 西洋ワサビペルオキシダーゼによるBPAおよびその誘導体の除去

西洋ワサビチロシナーゼ(E.C 1.11.1.7, 224U/mg-solid)はSigma Aldrich(株)から、BPAとその誘導体は東京化成工業(株)から購入し、いずれも市販品をそのまま使用した。2.5mMの

BPA 溶液を対象として本方法によって除去する際の至適条件(pH, 温度, 過酸化水素濃度, ポリエチレングリコール(PEG)の濃度と分子量など)を決定した後(8), 本方法をビスフェノール誘導体の除去に応用させた。

pH6.0 のリン酸緩衝溶液とエタノールからなる混合溶媒を溶媒として調製した 5.0mM の BPA 溶液に, pH6.0 の緩衝溶液を溶媒として調製した HRP 溶液, 分子量 1.0×10^4 のポリエチレングリコール(10K-PEG)溶液, 過酸化水素溶液を加えて酵素反応を開始させ, 所定時間ごとに濁度と残量濃度を測定した。BPA(2.5mM)の除去における至適条件を決定し, 種々のビスフェノール誘導体の除去を行った。BPA 及びその誘導体の残留濃度は Inertsil ODS-2 を用いた HPLC 法によって求め, 移動相のアセトニトリル水溶液の組成は使用したビスフェノール誘導体の種類によって調節した。

3. 結果と考察

3.1 麹菌チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去

マッシュルームチロシナーゼとキトサンビーズを用いた *p*-クレゾールの除去における至適条件は pH7.0, 45°C と決定されたので, この方法で種々の *p-n*-アルキルフェノールの除去を行った結果, 95%以上の除去率が得られた(4, 5)。ここでは, 同様に麹菌チロシナーゼとキトサンビーズを用いた際の *p-n*-アルキルフェノールの除去を検討した。麹菌チロシナーゼを用いた際の至適条件はマッシュルームチロシナーゼを用いた際とは異なり, pH6.0, 30°C と決定できた(8)。このような結果は, 由来の異なる同一の酵素を用いる際に多く見られ, 酵素自身のアミノ酸配列や分子量などが異なるためと言われている。図 1 に示すように, pH6.0, 30°C で

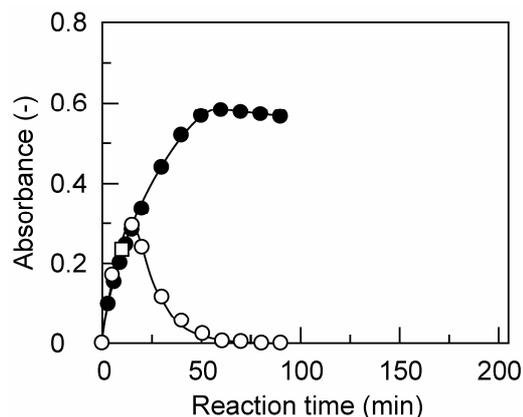


Figure 1 Enzymatic removal of *p*-cresol by the quinone conversion with *Aspergillus oryzae* tyrosinase and subsequent quinone adsorption in the absence (●) and presence of chitosan beads of $0.025 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ at pH 6.0 and 30 °C

0.5mM の *p*-クレゾール溶液に $150 \text{ U}/\text{cm}^3$ の麹菌チロシナーゼを加える(●印)と, キノン形成を示す波長 400nm の吸光度が上昇し, *p*-クレゾールが酵素反応によってキノン転化したことがわかる。

$0.025 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ のキトサンビーズを含む *p*-クレゾール溶液に麹菌チロシナーゼを加える(○印)と, 吸光度の上昇が抑えられ, 吸光度は反応時間とともに低下した。これは酵素反応によって形成したキノン化合物がキトサンビーズ中のアミノ基と反応し, 除去されたことを示す。また, 添加したキトサンビーズ添加量が多いほど, 吸光度の低下は顕著であることがわかったが, キトサンビーズ量 $0.025 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ では反応時間 100 分で *p*-クレゾールはほぼ完全に除去されたので, さらにアルキル鎖長 2~9 の *p-n*-アルキルフェノールの除去実験を行った。ここで, 形成したキノンのキトサンとの反応はキノン化合物の水付加反応と競争的に進行するので(11),

Table 1 Removal of *p-n*-alkylphenols by the combined use of *Aspergillus oryzae* tyrosinase and chitosan beads at pH 6.0 and 30 °C.

<i>p</i> -alkylphenol	Initial conc. (mM)	Tyrosinase conc. (U/cm^3)	Chitosan beads (cm^3/cm^3)	Conversion %	Adsorption %	Removal %	Time (min)
<i>p</i> -cresol	0.50	150	0.025	100	100	100	100
4-ethylphenol	0.50	150	0.025	100	100	100	120
4- <i>n</i> -propylphenol	0.50	150	0.025	100	100	100	110
4- <i>n</i> -butylphenol	0.50	150	0.100	100	97.6	97.6	90
4- <i>n</i> -pentylphenol	0.50	150	0.100	100	97.6	97.6	120
4- <i>n</i> -hexylphenol	0.30	150	0.100	100	98.3	98.3	120
4- <i>n</i> -heptylphenol	0.10	150	0.025	100	100	100	80
4- <i>n</i> -octylphenol	0.05	150	0.025	100	100	100	120
4- <i>n</i> -nonylphenol	0.05	150	0.025	100	100	100	3

キトサンビーズ添加量が少ないと除去率が低下した。pH6.0, 30°Cで行った *p-n*-アルキルフェノールの除去実験の結果を表1にまとめた。*p-n*-ブチルフェノール, *p-n*-ペンチルフェノール, *p-n*-ヘキシルフェノールでは生成したキノン化合物のキトサンビーズへの吸着が遅かったため、キトサンビーズ量を 0.100cm³/cm³に増加させて除去実験を行った。いずれの *p-n*-アルキルフェノールに対しても 97%以上の除去率が得られ、高く除去できることがわかった。さらに、分岐状の *p*-アルキルフェノールの除去における結果を表2にまとめた。麴菌チロシナーゼによる分岐状の *p*-アルキルフェノールのキノン酸化と形成したキノン化合物のキトサンビーズへの吸着はいずれも *p-n*-アルキルフェノールに比べて遅かったため、麴菌チロシナーゼ濃度とキトサンビーズ添加量を上昇させて行う必要があったが、総じて 90~100%の除去率が得られた。4-*tert*-ブチルフェノール(4TBP)は過酸化水素存在下においてマッシュルームチロシナーゼによってキノン酸化することが報告されているが(11), 麴菌チロシナーゼは過酸化水素なしで弱いエストロゲン作用があるとされている。4TBP, 4-*tert*-ブチルフェノール, 4-*tert*-ペンチルフェノールをキノン酸化し、本方法によって効率的に除去することができた。

3. 2 西洋ワサビペルオキシダーゼによる BPA の除去

HRP は過酸化水素存在下においてアルキルフェノールをラジカル化し、形成したフェノキシラジカルの自己重合による水不溶性オリゴ

マーの形成によって沈殿除去できるので、本方法を BPA の除去に応用した。BPA は過酸化水素存在下で HRP によってラジカル化された。反応時間 180 分での BPA(2.5mM)の残留率は過酸化水素濃度の上昇とともに低下し、溶液は不溶性のオリゴマーの形成により高く白濁した。この際、[BPA]/[H₂O₂]=1.0 の条件で、反応時間 180 分での残留率が 0%となった。これは HRP の触媒活性が過酸化水素存在下のみで進行するため、低濃度の過酸化水素では、BPA をラジカル化するために必要な過酸化水素が不足し、逆に過酸化水素が過剰に存在すると、HRP の一部が不活性な形態へと変化するためと言われている(12)。また、酵素反応開始時に PEG を加えると、酵素反応によって形成したフェノキシラジカルや自己重合生成物が PEG との間で可溶性の複合体を形成し、HRP の活性の低下を抑えるため(13), BPA の処理をさらに短時間で進行させることができた。さらに、諸条件を変化させて 2.5mM の BPA の処理を検討した結果、pH6.0, 30 °C, [BPA]/[H₂O₂]=1.0, [HRP]=1.0U/cm³, [10K-PEG]=0.1mg/cm³ を至適条件として決定できたので、この条件で種々のビスフェノール誘導体の除去実験を行い、その結果を表3にまとめた。20U/cm³まで濃度を上昇させても HRP はビスフェノール S と 2,4'-ジヒドロキシジフェニルスルホンに対しては活性を示さなかったが、他の 11 種類のビスフェノール誘導体に対しては活性を示し、活性が低い対象物質に対しては HRP 濃度を上昇させる必要はあるが、残留率を 5~0%まで低下させることができた。さらに、酵素反応処理後、溶液の pH を塩酸で 4.0 まで低

Table 2 Removal of branched *p*-alkylphenols by the combined use of *Aspergillus oryzae* tyrosinase and chitosan beads at pH 6.0 and 30 °C.

<i>p</i> -alkylphenol	Initial conc. (mM)	Tyrosinase conc. (U/cm ³)	Chitosan beads (cm ³ /cm ³)	Conversion %	Adsorption %	Removal %	Time (min)
4-isopropylphenol	0.50	150	0.025	92.8	90.5	84.0	180
		200	0.025	100	100	100	120
4- <i>sec</i> -butylphenol	0.50	150	0.025	88.6	83.3	73.8	120
		200	0.025	100	82.3	82.3	180
		200	0.050	100	100	100	160
4- <i>tert</i> -butylphenol	0.50	150	0.025	92.1	54.5	50.2	180
		200	0.025	95.6	57.8	55.3	180
		200	0.050	95.2	72.6	69.1	180
		250	0.050	100	71.1	71.1	300
		250	0.100	100	90.6	90.6	480
4- <i>tert</i> -pentylphenol	0.50	150	0.025	84.9	86.2	73.2	360
		250	0.050	94.9	87.9	83.4	360
		250	0.100	96.0	95.4	92.6	360
		250	0.150	95.5	100	95.5	480

Table 3 Removal of BPA and its derivatives (2.5 mM) with horseradish peroxidase at pH 6.0 and 30 °C [bisphenol derivative]=[H₂O₂], [10K-PEG]=0.1 mg/cm³

Bisphenol derivatives	[HRP] (U/cm ³)	% residual	Absorbance at pH 4	Color of filtrant
bisphenol A	1.0	0	0.012	transparent
bisphenol B	5.0	0	0.006	transparent
bisphenol C	1.0	0	0	transparent
bisphenol E	1.0	0	0.001	transparent
bisphenol F	1.0	0	0.001	transparent
bisphenol S	20.0	no activity		
bisphenol T	1.0	0	0.001	transparent
bisphenol Z (0.5mM)	2.0	0	0.21	white
diphenolic acid	20.0	5.1	1.080	white
2,4'-dihydroxydiphenylsulfone	20.0	no activity		
2,4'-dihydroxydiphenylmethane	1.0	0	0.001	transparent
2,4'-dihydroxybenzophenone	20.0	3.9	0.021	transparent
4,4'-dihydroxybenzophenone	20.0	5.5	0.65	white
4,4'-dihydroxydiphenyl ether	0.1	0	0.004	ocher

下させると、形成した不溶性オリゴマーの凝集が起こりやすくなるので、溶液を容易にろ過することができ、無色透明な溶液が得られた。これらの結果から本方法によって BPA およびその誘導体を効率的に除去できることがわかり、HRP による処理後に溶液の pH を 4.0 に低下させることで、不溶性オリゴマーのろ別が容易となったことは分別除去する過程での重要な結果といえる。

4 結言

本年度では麹菌チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールと西洋ワサビペルオキシダーゼによる BPA とその誘導体の除去について至適条件の決定とその利用性の展開について述べたが、今後は個々の酵素の特徴を活かした利用方法をさらに見だし、他の環境汚染物質の除去への応用を検討する。また、工業的な利用(実用化)を考える上で、酵素の反復利用は重要な課題であり、これらの酵素の高分子担体への共有結合を介した固定化と固定化条件を検討することで、高く活性を保持した安定な固定化酵素の構築を目指すことが今後の研究課題である。

5 参考文献

- Guillette, L. J., Gunderson, M. P., *Reproduct.*, **122**, 857-864 (2001).
- 稲森悠平, 宇都宮暁子, "非イオン界面活性剤と水環境"日本水環境学会[水環境と洗剤研究委員会]編, 技報堂出版, p.113-136 (2000).
- Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A. G. M.,

- Bowmer, T., *Aqua. Toxicol.*, **43**, 77-92 (1998).
- Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, T., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823-829 (2005).
- Yamada, K., Inoue, T., Akiba, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., and Hirata, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2467-2475 (2006).
- M. Ghiourelis, J. A. Nicell, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **75**, 98-106 (2000).
- K. Ikehata, I. D. Buchanan, D. W. Smith, *J. Environ. Eng. Sci.*, **2**, 463-472 (2003).
- 山田和典, 井上友明, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 第 20 回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集, p172-173 (2006).
- 池田尚也, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 山田和典, 日本化学会第 87 春季年会予稿集, 4K3-02.
- Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., and Ichishima, E., *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 400-405 (2004).
- Jiménez, M., and Carcía-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33-39 (1996).
- Wright, H., and Nicell, J. A., *Bioresource Technol.*, **70**, 69-79 (1999).
- Duarte-Vázquez, M. A., Ortega-Tovar, M. A., García-Almendarez, B. E., and Regalado, C., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 42-47 (2002).