

酵素酸化とキノン吸着を利用したナフトール類の除去

日大生産工(院) ○木村 悠二

日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

ナフトール類は染料、顔料、医薬品、プラスチック、ゴムおよび合成繊維を生産するための中間体化学薬品であり、生態系に対して強い毒性があるとされている。ナフトール類の主な排出要因は、工業排水、産業廃棄物場からの溶出であり、化学的または生物学的な処理法が検討されているが、我々は小規模かつ低コストで行う方法として酵素反応を利用した除去法に着目している。しかし、これまでに酸化還元酵素であるペルオキシダーゼによるナフトール類の処理に関する報告はあるが、チロシナーゼを用いた報告はほとんどない。そこで、本研究では、酸素存在下でクレゾラーゼ活性とカテコラーゼ活性の2段階の酵素活性をもつマッシュルーム由来のチロシナーゼを用いてナフトール類のキノン酸化を行った。マッシュルームチロシナーゼは種々のフェノール化合物をキノン酸化することができ、酵素反応によって形成したキノンはアミノ基と高く反応するため、キトサンビーズへのキノン吸着によってフェノール化合物を効果的に除去できる¹⁾。そこで、我々はマッシュルームチロシナーゼによって1-ナフトールをキノン酸化させる際のpH、温度、酵素濃度などの至適条件を決定し、キトサンビーズへのキノン吸着による水溶液中からの1-ナフトールの除去を検討した。さらに本方法を2-ナフトールの除去へ応用した。

【実験】

<試料および溶液調製>

Sigma社からマッシュルーム由来のチロシナーゼを購入し、その比活性は3960U/mgであった。異なるpHのリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて0.40mMの1-ナフトール、50U/cm³のチロシナーゼ溶液を調製した。キトサンビーズ(粒径:70~200μm, 比表面積:70~100m²/g, 含水量:92.5%)は富士紡績(株)から購入し、緩衝溶液中に保存した。1-ナフトールと2-ナフトールは市販品をそのまま使用した。

<酵素反応によるキノン酸化>

1-ナフトール溶液にチロシナーゼを加えることで酵素反応を開始させ、所定時間ごとに波長520nmでの吸光度を測定し、pH、温度などの諸条件を変化させて1-ナフトールのキノン酸化における至適条件を決定した。さらにキトサンビーズを加えてキノン吸着による1-ナフトールの除去を検討し、本方法を2-ナフトールの除去へ応用した。

<HPLC法による転化率の測定>

反応溶液から採取した溶液0.5cm³を80°Cの恒温槽中に10分間浸して酵素を失活させた後、マイクロシリンジで20μm³をHPLCへ注入した。GLサイエンス(株)製のInertsil ODS-3カラムを用いて45%アセトニトリル水溶液を流速1.0cm³/minで送液し、保持時間8.5分でのピーク面積から転化率を求めた。2-ナフトールにおいては1-ナフトールと同様の条件で保持時間7.5分でのピーク強度から転化率を求めた。

【結果および考察】

1-ナフトール溶液にチロシナーゼを添加すると1-ナフトールは徐々にキノン酸化され、沈殿が形成した。遠心分離前後の吸光度から反応開始5分後から沈殿が形成していたことが確認できた。この沈殿は、酵素反応によって形成したキノンがカップリング反応によってキノンオリゴマーとなり、沈殿したと考えられる。これまでの報告でマッシュルーム由来のチロシナーゼを用いたアルキルフェノールやビスフェノールAのキノン酸化では沈殿の生成が確認されなかったもので、化学構造、溶解性、キノン濃度などに依ると考えられる²⁾。キノン酸化させる際の至適pHと温度を検討した。pHに対する初速度と反応時間5時間での吸光度、転化率の変化を図1に示す。初速度、吸光度、転化率ともにpH8.0で最大値を示したことから至適pHを8.0と決定した。次に、pH8.0でキノン酸化の至適温度を検討した。温度に対する初速度と反応時間300分での吸光度、転化率の変化を図2に示す。いずれの値も40°Cで最大値を示したことから40°Cを至適温度と決定した。

Removal of Naphthols through Enzymatic Oxidation and Subsequent Quinone Adsorption

Yuji KIMURA, Ayumi KASHIWADA,
Kiyomi MATSUDA, and Kazunori YAMADA

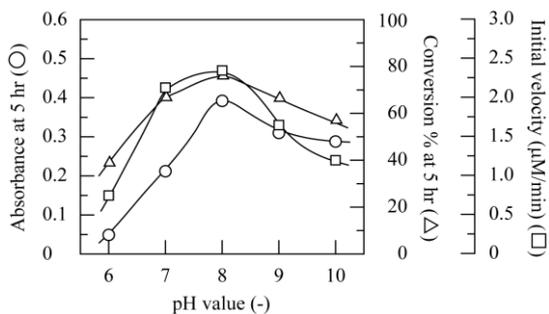


Figure 1 The effect of pH value on tyrosinase-catalyzed (10 U/cm^3) quinone oxidation of 1-naphthol (0.30 mM) at 40°C .

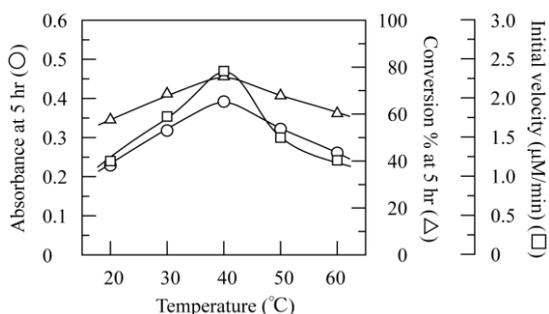


Figure 2 The effect of temperature on tyrosinase-catalyzed (10 U/cm^3) quinone oxidation of 1-naphthol (0.30 mM) at $\text{pH } 8.0$.

至適条件においてキトサンビーズを添加し、1-ナフトールの除去実験を行った。酵素濃度 20 U/cm^3 における反応時間に対する吸光度と転化率の変化を図3に示す。生成したキノンがキトサンビーズに吸着されることで吸光度が低下し、反応時間2時間で吸光度がゼロとなった。また、反応時間8時間で転化率が100%に達し、1-ナフトールを完全に除去できた。この時の初速度はキトサンビーズが不在のときの1.15倍となり、キノン吸着によって溶液中のキノン濃度が低下することで、酵素の反応速度が上昇したことがわかった。

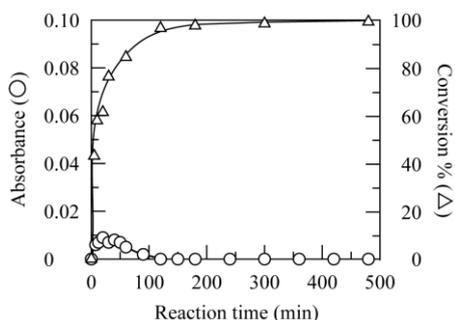


Figure 3 The time course of the absorbance (O) and conversion % value (Δ) for tyrosinase-catalyzed (20 U/cm^3) quinone oxidation of 1-naphthol (0.30 mM) at $\text{pH } 8.0$ and 40°C in the presence of chitosan beads at $0.10 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$.

さらに、至適条件を2-ナフトールにおいても検討した結果、1-ナフトールと同様に $\text{pH } 8.0$, 40°C で初速度と反応時間5時間での転化率が最大値を示したことからキノン酸化の至適条件と決定した。1-ナフトールを完全除去できた酵素濃度 20 U/cm^3 では反応時間5時間で転化率が26%と低かったため、酵素濃度を上げた結果 300 U/cm^3 で反応時間5時間で転化率89%に達した。 200 U/cm^3 で反応時間を48時間まで延ばすことによって、2-ナフトールを完全に除去できた。ナフトール類に対する除去率、除去時間、キトサンビーズ量などを表1にまとめた。表1に示すように酵素濃度、キトサンビーズ量を上昇させることによって1-ナフトールと2-ナフトールをより効果的に除去できた。

Table 1 Removal of 1-naphthol and 2-naphthol through tyrosinase-catalyzed quinone oxidation and subsequent quinone adsorption on chitosan beads at $\text{pH } 8.0$ and 40°C .

Concentration of tyrosinase (U/cm^3)	Absence of chitosan beads		Presence of chitosan beads		
	Conversion % at 5 h (%)	Amount of added chitosan beads (cm^3/cm^3)	Removal % at 5 h (%)	Removal time (h)	
1-naphthol					
2	24.1	0.10	69.1		
5	45.7	0.10	94.0		
10	76.0	0.10	96.3		
15	87.2	0.10	97.9		
		0.15	98.1		8
		0.20	99.2		6
20	91.1	0.10	98.5		8
		0.15	100		5
		0.20	100		4
25	98.8	0.10	98.9		7
30	98.9	0.10	100		3
2-naphthol					
20	30.1	0.10	31.5		
100	68.1	0.10	68.6		
200	81.3	0.10	81.4		48
		0.20	82.8		42
300	89.2	0.10	92.3		30

【結論】

上記の結果から、マッシュルーム由来のチロシナーゼによる1-ナフトールのキノン酸化における至適条件は、 $\text{pH } 8.0$, 40°C と決定できた。また、キトサンビーズを添加すると酵素活性が上昇し、酵素濃度 20 U/cm^3 以上で1-ナフトールを完全に除去できることが明らかとなった。また、2-ナフトールにおける至適条件を $\text{pH } 8.0$, 40°C と決定でき、酵素濃度 200 U/cm^3 で完全に除去できた。今後、ナフトール誘導体についても同様に至適条件を決定し、水溶液中からの除去の検討を行う予定である。

【参考文献】

- 1) K. Yamada, A. Akiba, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823 (2005).
- 2) M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **118**, 721 (2010).