

ポリフェノールオキシダーゼとキトサンを用いたナフトール類の除去

日大生産工(院) ○篠崎 文義
日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

フェノール化合物の1つであるナフトールは染料や医薬品、農薬などを生産するための中間体化学薬品として用いられているが、水生生物に対して非常に強い毒性を有する。またナフトールと類似した構造を持つジヒドロキシナフタレンは耐熱樹脂原料や医薬品中間体として用いられているが、河川や海に流出することで環境に悪影響を及ぼす恐れがある。ナフトール類を除去するために物理的または化学的処理法が検討されているが、ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)やペルオキシダーゼなどの酸化還元酵素を利用した処理法は、従来の処理法と比較して簡易かつ環境負荷の少ない。これまでペルオキシダーゼを用いたフェノール化合物の処理に関する研究は幅広く行われているが¹⁾、PPOを用いた報告は少ない。本研究では、PPOによる1-ナフトールのキノン酸化におけるpH、温度、酵素濃度依存性を評価し、さらに生成したキノンのキトサンへのキノン吸着の効果を検討した。また、本方法を1-ナフトールの構造異性体である2-ナフトールおよびナフトール誘導体であるジヒドロキシナフタレンの除去へ応用した²⁾。

【実験】

<試料および溶液調製>

Worthington Biochemical製のマッシュルーム由来のPPOを使用し、比活性は965U/cm³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-ナフトール溶液と400U/cm³のPPO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)は富士紡績(株)から購入し、所定のpHの緩衝溶液中に保存した。

<酵素反応によるキノン酸化>

1-ナフトール溶液にPPO溶液を加えることによって酵素反応を開始させ([1-ナフトール]=0.30mM, [PPO]=100U/cm³)、所定時間ごとに反応溶液のUV-visibleスペクトル(190~

600nm)を測定し、波長530nmでの吸光度の上昇をキノン形成の尺度とした。さらに反応溶液に所定量のキトサンビーズを加え、キノン吸着による除去実験を行った。また、2-ナフトール、1,3-ジヒドロキシナフタレンおよび1,5-ジヒドロキシナフタレンのキノン形成の尺度をそれぞれ波長326nm, 452nm, 450nmとし、同様に除去実験を行った。

<HPLC法による転化率の測定>

反応溶液から採取した溶液を80℃加熱して酵素を失活させた後、マイクロシリンジを用いて溶液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50vol%のアセトニトリル水溶液を流速1.0cm³/minで送液し、保持時間6.6分でのピーク面積から転化率を求めた。また、2-ナフトールおよびナフトール誘導体においてはアセトニトリルの組成を変化させて保持時間を6~8分に調節し、1-ナフトールと同様に転化率を求めた。

【結果および考察】

1-ナフトール溶液にPPOを添加すると、酵素反応により溶液は紫色に変色し、吸光度は時間とともに上昇した。反応を続けると沈殿物の形成が確認できた。沈殿物の形成は、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ためと考えられる。

1-ナフトールをキノン酸化させる際の至適pHと至適温度を酵素濃度100U/cm³で検討した。pHに対する反応時間5時間での転化率と吸光度および反応時間に対する転化率の反応初期の傾きから求めた初速度を図1に示す。吸光度と同様に転化率、初速度でも最大値を示したため、至適pHを8.0と決定した。次に、pH8.0で至適温度を検討した。温度が高くなるにつれて初速度が上昇し、60℃で最大となったが、温度が高くなると酵素の失活により転化率が減少し、反応時間5時間での転化率が

Removal of naphthols by combined use of polyphenol oxidase and chitosan

Fumiyoshi SHINOZAKI, Ayumi KASHIWADA,
Kiyomi MATSUDA, Kazunori YAMADA,

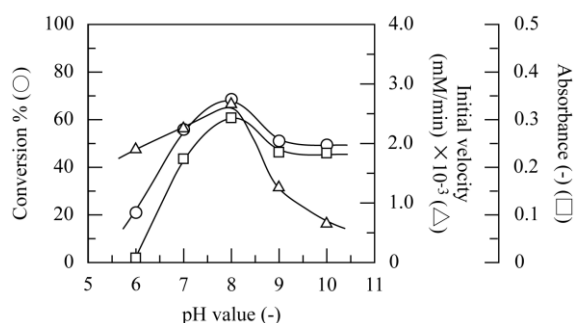


Figure 1 The effect of pH value on PPO-catalyzed (100 U/cm^3) quinone oxidation of 1-naphthol (0.30 mM) at 40°C

最大となった 40°C を至適条件と決定した。

$\text{pH} 8.0$, 40°C で反応溶液中に $0.10 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ のキトサンビーズを分散させて酵素反応を開始させた。反応時間に対する吸光度と転化率の変化を図 2 に示す。キトサンビーズ存在下では反応開始後 10 分で吸光度がゼロになり、酵素反応によって形成されたキノンがキトサンビーズに化学吸着した。また、転化率の上昇がキトサンビーズを添加しないときより大きくなった。これはキノンが溶液中から除去されることによって酵素反応が促進したためと考えられる。このとき、1-ナフトールの転化率は 24 時間で 98.7% となった。またキトサンビーズ量を $0.20 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ に増加させると 24 時間で 1-ナフトールを完全に除去でき、さらに酵素濃度を 200 U/cm^3 に上げると除去時間を 8 時間に短縮できた。

同様に 2-ナフトールのキノン酸化の至適条件を検討し、 $\text{pH} 9.0$, 40°C と決定した。2-ナフトールは 1-ナフトールと比較して転化率が低かったため、酵素濃度を 300 U/cm^3 まで上げ、キトサンビーズ量を $0.20 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ とすると反応時間 30 時間での転化率は 54.7% に達した。また、2-ナフトールの初期濃度に対する転化率の

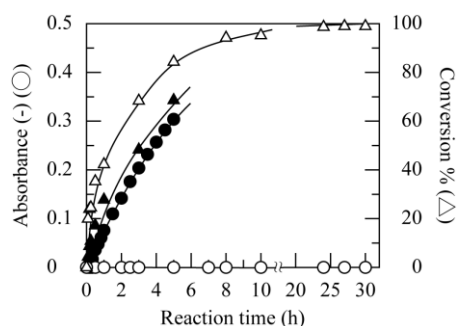


Figure 2 Removal of 1-naphthol through PPO-catalyzed quinone oxidation and quinone-adsorption on chitosan beads in the absence ($\bullet$, $\blacktriangle$) and presence of chitosan beads of 0.10 ($\circ$, $\triangle$) cm^3/cm^3 at $\text{pH} 8.0$ and 40°C

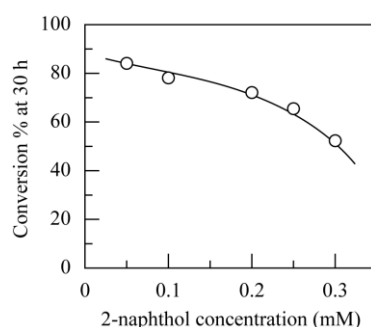


Figure 3 PPO-catalyzed (300 U/cm^3) quinone oxidation of 2-naphthol at different concentrations in the presence of chitosan beads ($0.20 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$) at $\text{pH} 9.0$ and 40°C

変化を図 3 に示す。2-ナフトールの濃度を低くすることで高い転化率が得られ、濃度を 0.05 mM まで低くしたときの転化率は 84.1% となった。

さらにナフトール誘導体である 1,3-ジヒドロキシナフタレンおよび 1,5-ジヒドロキシナフタレンの除去を 1-ナフトールのキノン酸化の至適条件で検討した。1,3-ジヒドロキシナフタレンは酵素濃度を 30 U/cm^3 , キトサンビーズ量を $0.10 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ とすると 8 時間で転化率が 100% となったが、吸光度がゼロにならず生成したキノンが溶液中に残存した。そこで、キトサンビーズ量を $0.20 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ に増やすことで吸光度が低下し、キノンをより吸着させることができた。また、1,5-ヒドロキシナフタレンでは酵素濃度を 10 U/cm^3 , キトサンビーズ量を $0.20 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ とすると反応開始後 3 時間で吸光度ゼロ、5 時間で転化率 100% となり、1,5-ジヒドロキシナフタレンを 5 時間で完全に除去できた。

【結論】

マッシュルーム由来の PPO とキトサンビーズを用いてナフトール類の除去検討した結果、1-ナフトールと 1,5-ジヒドロキシナフタレンを完全に除去できた。また、2-ナフトールと 1,3-ジヒドロキシナフタレンは、初期濃度を減らしたり、キトサンビーズ量を増やすことでさらに高い除去率が得られると考えられる。今後は他のナフトール類の除去を検討する。

【参考文献】

- [1] K. Yamada, T. Shibuya, M. Noda, N. Uchiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2503 (2007).
- [2] Y. Kimura, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **125**, E42 (2012).