

## 酸化還元酵素とキトサンによる分岐状アルキルフェノールの除去

日大生産工(院) ○川端慧浩

日大生産工 木村悠二 柏田 歩 山田和典

【諸論】合成樹脂、酸化防止剤や非イオン性界面活性剤の製造原料であるアルキルフェノールは内分泌かく乱作用があることが懸念されており、生体内の取り込まれると発がん性や遺伝子異常、免疫系への影響が危惧されている。

これまでに活性汚泥法や活性炭吸着、オゾン酸化法などの化学的処理法による分解や除去に関する研究が報告されているが、処理速度が遅い、高濃度の汚染物質の除去に適さないなどの課題があるため、短時間で効率的に処理する方法として酸化還元酵素の利用に着目した。酸化還元酵素にはラッカーゼ、チロシナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)などがあり、PPOは酸素存在下でフェノール化合物をカテコールに酸化させるクレゾラーゼ活性とカテコールをキノンに酸化させるカテコラーゼ活性の2段階の酵素活性をもつ<sup>1)</sup>。チロシナーゼは過酸化水素( $H_2O_2$ )の添加を必要とする<sup>2)</sup>ため、本研究では $H_2O_2$ の添加を必要としないPPOによるアルキルフェノールのキノン酸化における至適条件を検討する。また、酵素反応により生成するキノン化合物はアミノ基と高い反応性を示すため、分子内に多くのアミノ基を有するキトサンにキノンを吸着させるために溶液中にキトサンビーズを分散させて形成したキノンのキトサンビーズへのキノン吸着の効果を検討した。

### 【実験】

〈試料および溶液調製〉

Worthington Biochemical 社からマッシュルーム由来のPPOを購入し、その比活性は1070U/mgであった。pH7.0のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて0.40mMのアルキルフェノール溶液、50U/cm<sup>3</sup>のPPO溶液を調製した。富士紡績(株)からキトサンビーズ(粒径:70~200 $\mu$ m, 比表面積:70~100m<sup>2</sup>/g)を購入し、緩衝溶液中に保存した。東京化成工業(株)から実験に用いた3種類のアルキルフェノールを購入した。

〈PPOによるキノン酸化とキトサンビーズによる吸着〉

pH7.0, 40℃でアルキルフェノール溶液にPPO溶液を加えることによって酵素反応を開始させ、所定時間ごとにそれぞれの最大吸収波長における吸光度をキノン形成の尺度とし、キトサンビーズを分散させたアルキルフェノール溶液にPPOを加えて除去実験を行い、所定時間ごとに溶液の吸光度を測定し、キノン吸着による溶液中からの除去を検討した。

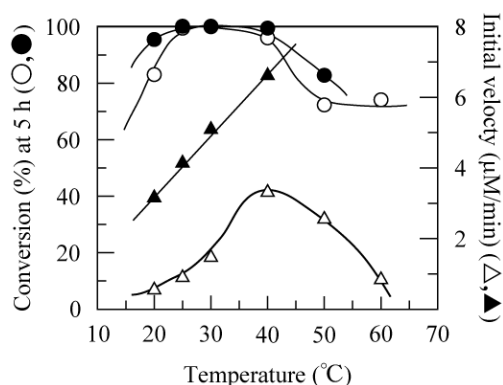
〈HPLC法による転化率の算出〉

所定時間ごとに反応溶液から採取した溶液1.0cm<sup>3</sup>を、80℃の恒温槽中に2分間浸して酵素を失活させた後、溶液20mm<sup>3</sup>をHPLCに注入し、アルキルフェノールごとにアセトニトリル水溶液の組成を調整し、送液した際に保持時間が6~8分となるよう設定し、初期濃度でのピーク面積比から転化率を求めた。

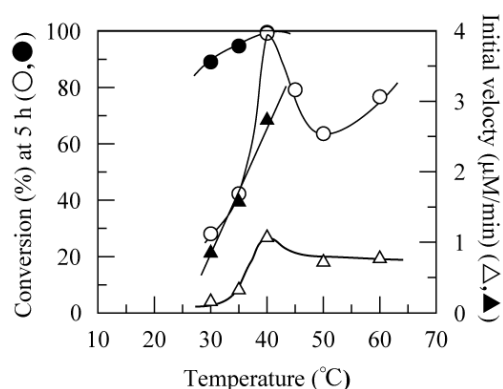
【結果および考察】ビスフェノールAのキノン酸化の至適条件であるpH7.0, 40℃で<sup>3)</sup>PPOによるアルキルフェノールのキノン酸化を行ったところ、キノンが生成し溶液が黄色に変化した。PPO濃度10U/cm<sup>3</sup>で温度に対する反応時間5時間での4-イソプロピルフェノール(4IPP)のキノン酸化における転化率と初速度を図1に示す。初速度が最も高いのは40℃のときであったが、反応時間5時間での転化率は100%とならなかったため、反応温度を30℃に下げたところ、転化率100%となったので30℃を至適温度とした。PPO濃度25U/cm<sup>3</sup>で4-tert-ブチルフェノール(4TBP)のキノン酸化の転化率と初速度を図2に示す。初速度が最も速かったのは40℃のときであり、このときの反応時間5時間での転化率は100%だったので至適温度は40℃と決定した。また、PPO濃度30U/cm<sup>3</sup>で4-tert-ペンチルフェノール(4TPP)のキノン酸化における転化率と初速度を図3に示す。初速度が最

The removal of the branched alkyl phenol by oxidation-reduction enzyme and chitosan

Masahiro KAWABATA Yuji KIMURA Ayumi KASHIWADA and Kazunori YAMADA



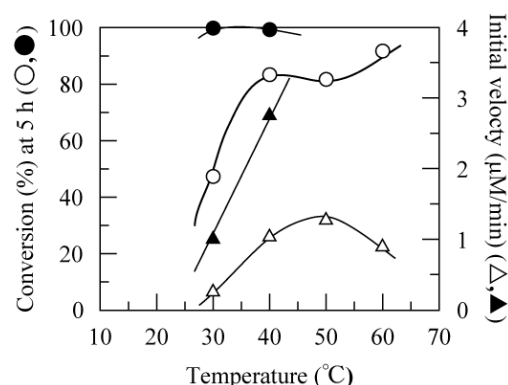
**Fig. 1** The effect of temperature on PPO-catalyzed quinone oxidation of 4IPP in the absence (○,△) and presence (●,▲) of chitosan beads of 0.10 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> at pH 7.0.



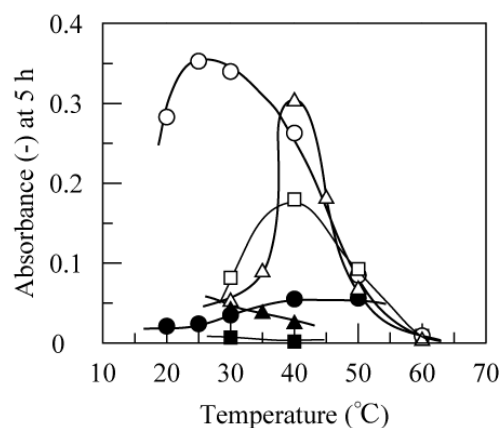
**Fig. 2** The effect of temperature on PPO-catalyzed quinone oxidation of 4TBP in the absence (○,△) and presence (●,▲) of chitosan beads of 0.10 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> at pH 7.0.

も高かったのは50℃のときであったが、反応時間5時間での転化率が最も高いのは60℃であった。以上のことからアルキルフェノールのPPOによるキノン酸化はアルキル鎖の長さと嵩高さに関与し、疎水性が高いほど酵素との親和性が低くなるため、高い酵素濃度を必要とした。また、各アルキルフェノール溶液中にキトサンビーズを分散させることにより、キノン酸化によって生成したキノンを吸着することで酵素活性の低下が抑制され、初速度が速くなり、4TBPは完全に除去することができた。しかし、4IPPと4TPPの吸光度はわずかに上昇したままであった。これは生成したキノンが不安定であり、完全に吸着されずに溶液中で水和物等に転換したことによるものと考えられるため、キノン吸着と競争的に起こる水和反応を抑制するために温度を下げて実験を行ったが、完全に除去するには至らなかった。

【結論】pH7.0、30℃で4-IPPを、pH7.0、40℃で4-TBPを100%転化することができた。4TPPはpH7.0、60℃での溶液の吸光度の上昇がほと



**Fig. 3** The effect of temperature on PPO-catalyzed quinone oxidation of 4TPP the absence (○,△) and presence (●,▲) of chitosan beads of 0.10 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> at pH 7.0.



**Fig. 4** The absorbance in the absence of chitosan beads at 400nm(○) for 4IPP, at 396nm(△) for 4TBP and at 399nm(□) for 4TPP and in the presence of chitosan beads of 0.10(●,▲,■) cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> at pH 7.0.

んど見られなかったため、酵素反応によって生成したキノンではなく、熱酸化による生成物と思われる。そのため、至適温度は転化率が最も高く、キノンの吸収波長での吸光度の上昇が最も高かった40℃と決定した。キノン酸化の初速度は温度に依存し、キトサンビーズを添加することにより、酵素活性の低下が抑制され、初速度が速くなり、4TBPは完全に除去することができた。

#### 【参考文献】

- 1) M. Yoshida, H. Ono, Y. Mori, Y. Chuda, and M. Mori, *J. Agric. Chem.*, **50**, 4377-4381 (2002)
- 2) K. Yamada, T. Inoue, Y. Akiba, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2467-2475 (2006)
- 3) Y. Kimura, M. Yamamoto, R. Shimazaki, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **124**, 796-804 (2012)