

プロジェクト2

チロシナーゼとキトサンビーズを併用したフェノール系化合物の除去

山田 和典・柏田 歩・松田 清美・平田 光男（応用分子化学科）

1 緒論

水質汚染物質の1つであるフェノール系化合物は製油、製鉄、染料合成など様々な工場から排出され、体内へ混入すると中枢神経障害や肝障害を、接触すると皮膚炎を起こすことがある。また、水道水源へ混入すると塩素処理時にクロロフェノールを発生して異臭を発することがある。このように工業廃水中からのフェノール系化合物の除去は環境保全の点からも重要であり、これまでに焼却法、活性汚泥法、オゾン酸化法、活性炭吸着法などの除去法が利用されているが、いずれの方法も高コストであり、また設備の大型化といった問題を抱えている。本研究では、上述したこれまでの方法に比べてより簡易的にフェノール系化合物を除去する方法として酵素反応とキトサンとの反応を利用した除去法の構築を目指した。

多くのフェノール系化合物は図1に示すように酸化還元酵素の一種であるチロシナーゼによりキノン酸化され¹⁾、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溶液を添加すると、凝集沈殿により除去できるが²⁾、フェノール系化合物の濃度に適した添加量範囲があり、適した添加量範囲以外では凝集効果が著しく低下し、除去効果が著しく低いといった問題がある。本研究では、マッシュルーム由来のチロシナーゼによりフェノール系化合物をキノン酸化させ、生成したキノン化合物をキトサンビーズに吸着させることでフェノール系化合物を除去する際の至適条件の決定と種々のフェノール系化合物への本法の応用を検討した。また、月桂冠株式会社から提

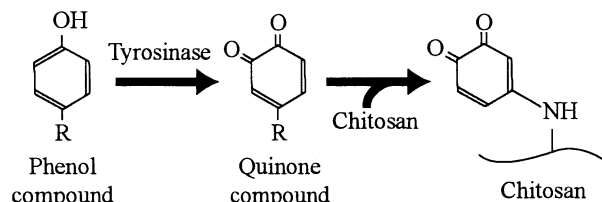


Fig. 1 Conversion of a phenol compound to the corresponding quinone compound and the subsequent chemical adsorption on chitosan.

供された麹菌(*Aspergillus oryzae*)チロシナーゼ(369U/mg)³⁾を本法に利用し、種々のフェノール系化合物の除去に対してマッシュルームチロシナーゼを用いて得られた結果と比較検討した。

2 実験

2. 1 酵素活性と至適条件の決定

pH7.0のリン酸緩衝溶液を溶媒として(Sigma Aldrich(株)製、EC 1.14.18.1, 2590U/mg)濃度100U/cm³のマッシュルームチロシナーゼ溶液を調製した。フェノール系化合物として和光純薬工業(株)製のp-及びm-クレゾール、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)及びカテコールを、東京化成工業(株)製の4-tert-ブチルフェノール(4TBP)、p-及びm-クロロフェノールを用い、リン酸緩衝溶液を溶媒として濃度1.0mMのフェノール系化合物溶液を調製した。また、和光純薬工業(株)製のキトサン1000からpH2.5~3.0、濃度1%キトサン塩酸溶液を調製した。このキトサン溶液2.0gを直径32mmのガラスシャーレ上に展開し、40℃で成膜した後、1.0MのNaOHで脱プロトン化した。

フェノール系化合物としてp-クレゾールを用いた場合、上記で調製したチロシナーゼ溶液20cm³と1.0mMのp-クレゾール溶液20cm³を45℃で混合した後、所定時間ごとに溶液のUV-visibleスペクトルを測定した。また、p-クレゾール+マッシュルームチロシナーゼ混合溶液に所定時間浸漬したキトサンフィルムのUV-visibleスペクトルを測定することでキノン化合物のキトサンとの反応性を評価した。さらに、酵素反応と吸着時のpH、温度及び酵素濃度などを変化させて至適条件を決定した。

2. 2 キトサンビーズを利用した吸着除去

p-クレゾールにおいて決定した至適条件であるpH7.0、45℃、酵素濃度50U/cm³で2. 1に示したフェノール系化合物に対する酵素

活性を評価した。フェノール系化合物 (0.5mM) + マッシュルームチロシナーゼ (50U/cm³) 混合溶液20cm³中にpH7.0の緩衝溶液中で膨潤させたキトサンビーズ(富士紡績(株)製, 粒径: 70~200 μ m, 比表面積: 70~100m²/g (いずれも公称値))を0.5cm³添加した。所定時間ごとに溶液のUV-visibleスペクトルを測定することで、フェノール系化合物の除去率を求めた。更に、経時的にフェノール系化合物の残留濃度を4-アミノアンチピリン(4AA)法と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法によって求め、初期濃度との関係から転化率と吸着率を算出した。

2. 3 麴菌チロシナーゼを利用した吸着除去

マッシュルームチロシナーゼにおいて決定した至適条件であるpH7.0, 温度45℃で麴菌チロシナーゼによるp-クレゾールのキノン酸化を評価した。さらに、キトサンビーズを添加した際のpHや温度などの至適条件を決定した後、至適条件においてマッシュルームチロシナーゼと同様に種々のフェノール系化合物に対する吸着除去を行った。

3 結果及び考察

3. 1 キノン生成及び吸着測定

45℃でpH7.0のp-クレゾール+マッシュルームチロシナーゼ混合溶液のUV-visibleスペクトルの経時変化を図2に示す。キノン化合物の極大吸収波長である波長400nmのピークが反応時間とともに上昇したことから、p-クレゾールがキノン酸化されたことがわかる。また、この混合溶液中に浸漬したキトサンフィルムは波長460nm付近にピークを有し、このピークは図3に示すように浸漬時間とともに上昇した。これらの結果は混合溶液に浸漬したキトサンフィルムが酵素反応によって生成したキノン化合物を吸着することを示す。更に、マッシュルームチロシナーゼによるp-クレゾールのキノン酸化と生成したキノン化合物のキトサンフィルムへの吸着のpHと温度依存性を検討した結果、至適条件をpH7.0, 45℃と決定した。

3. 2 4TBPの酵素活性とキトサンへの吸着

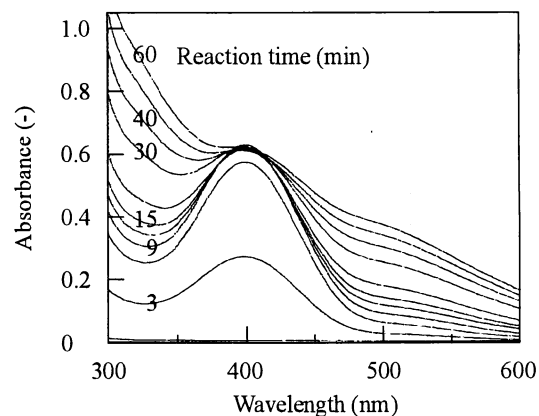


Fig. 2 Spectrophotometric recordings of a *p*-cresol and mushroom tyrosinase (50 U/cm³) mixture at pH 7.0 and 45 °C.

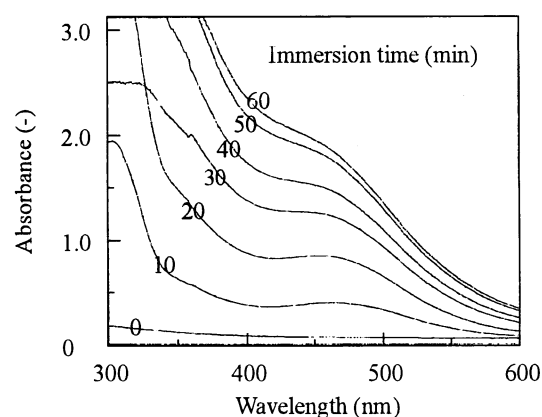


Fig. 3 Spectrophotometric recordings of the chitosan films incubated in a *p*-cresol (0.5mM) and mushroom tyrosinase (50 U/cm³) mixture at pH 7.0 and 45 °C.

4TBPではマッシュルームチロシナーゼによる酵素反応が進行しないが、過酸化水素存在下ではマッシュルームチロシナーゼによって酵素酸化を受けることに着目した⁴⁾。4TBP+マッシュルームチロシナーゼ混合溶液中に濃度が0.5mMとなるように過酸化水素を添加し、混合溶液のUV-visibleスペクトルを経時的に測定した。その結果、図4に示すようにキノン酸化を示す波長400nmの吸光度が上昇した。これは、met型で存在するチロシナーゼが過酸化水素から生成した酸素分子と結合して4TBPに対して触媒作用を示すoxy型に変換したためと考えられる⁴⁾。

3. 3 キトサンビーズを利用した吸着除去

pH7.0, 45℃でキトサンビーズを添加したp-クレゾール+マッシュルームチロシナーゼ混合溶液の波長400nmにおける吸光度の経時変化(◇)

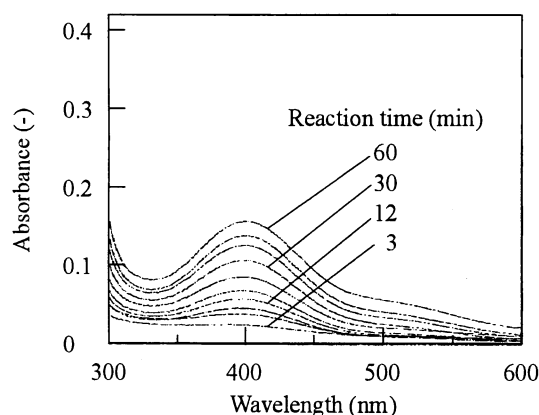


Fig. 4 Spectrophotometric recordings of a 4TBP and mushroom tyrosinase (50 U/cm³) mixture at pH 7.0 and 45 °C in the presence of H₂O₂ (0.5 mM).

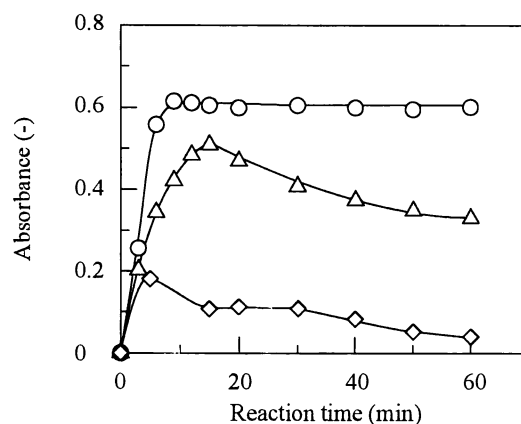


Fig. 5 Changes in the absorbance at 400 nm of the *p*-cresol and mushroom tyrosinase (50 U/cm³) mixtures with the chitosan beads (0.025 cm³/cm³) (◇) or a chitsan film (△), and without the chitosan beads (○) with the reaction time at 45 °C and pH 7.0.

Table 1 Removal of various phenol compounds by the combined use of mushroom tyrosinase-oxidation (50 U/cm³) and subsequent adsorption on the chitosan beads at 45 °C and pH 7.0.

Phenol compound	Chitosan beads (cm ³)	Conversion (%)	Adsorption (%)	Removal (%)
<i>p</i> -cresol	0.5	100	92.9	92.9
<i>m</i> -cresol	1.0	100	94.1	94.1
4EP	0.5	100	94.6	94.6
4NPP	0.5	100	93.7	93.7
4NBP	0.5	99.6	97.9	97.5
4TBP ^{a)}	0.5	49.0	15.9	7.8
	1.5	52.3	40.8	21.3
	2.5	58.0	56.8	32.9
catechol	0.5	98.4	100	98.4
<i>p</i> -chlorophenol	0.5	100	99.0	99.0
<i>m</i> -chlorophenol	0.5	72.0	98.3	70.8

a) Tyrosinase-oxidation of 4TBP was carried out in the presence of hydrogen peroxide of 0.5 mM in a pH 6.0 buffer.

をキトサンビーズを加えていない混合溶液(○)とキトサンフィルムを浸漬した混合溶液(△)と併せて図5に示す。マッシュルームチロシナーゼによるキノン酸化によって混合溶液の波長400nmの吸光度は反応時間10分まで上昇した後、一定となった。これに対し、キトサンビーズを添加した混合溶液の吸光度は非常に低く、キトサンフィルムを浸漬したときより多くのキノン化合物を吸着したことがわかる。キトサンビーズを添加した混合溶液の残留フェノール系化合物濃度から転化率を求めた。また、キトサンビーズを加えた混合溶液の波長400nmの吸光度をキトサンビーズを添加していない混合溶液の最大吸光度と比較することで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。種々のフェノール系化合物に対して行った結果を表1にまとめた。キトサンビーズを利用することで、*p*-及び*m*-クレゾール、炭素数4つまでの直鎖状アルキルフェノール、*p*-クロロフェノールに対して除去率が93%以上となり、高く吸着除去することがわかった。また、過酸化水素(0.5mM)存在下で酵素反応により4TBPから生成した4-tert-ブチル-*o*-ベンゾキノンもキトサンビーズへ吸着するが、他のフェノール系化合物から生成したキノン化合物に比べてキトサンとの反応性が低いので、反応系内へのキトサンビーズ添加量を表1に示すように増加させると、吸着率とキノン転化率は上昇したが、除去率は約33%に留まった。

3. 4 麴菌チロシナーゼを利用した吸着除去

pH7.0, 45°Cで*p*-クレゾール+麴菌チロシナーゼ混合溶液のUV-visibleスペクトルの経時変化を図6に示す。キノン生成を示す波長400nmのピークの上昇が0.1程度に留まり、酵素反応の進行が低かったため、麴菌チロシナーゼに対してpHと温度依存性を検討した結果、pH6.0, 30°Cが至適条件となり、この条件で*p*-クレゾール+麴菌チロシナーゼ混合溶液の波長400nmにおける吸光度は、マッシュルームチロシナーゼを用いたときと同様に0.6まで上昇した。

p-クレゾールにおいて決定した麴菌チロシナーゼの至適条件であるpH6.0, 30°Cで4TBPに対する酵素活性を測定した結果、図7に示すように波長400nmのピークが上昇した。マ

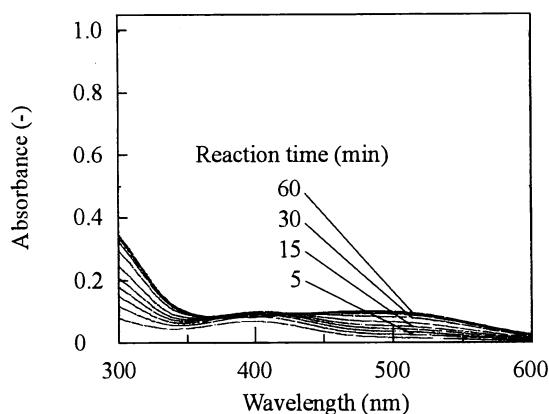


Fig. 6 Spectrophotometric recordings of a *p*-cresol and *Aspergillus oryzae* tyrosinase (50 U/cm³) mixture at pH 7.0 and 45 °C.

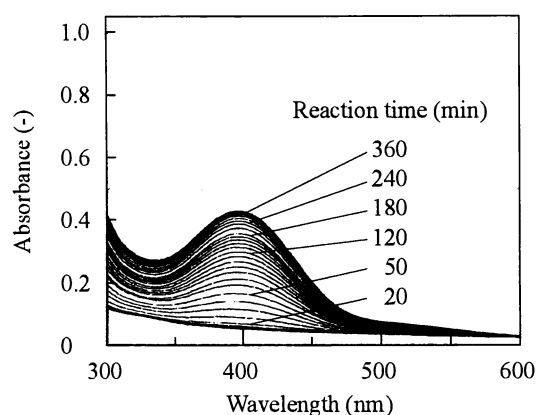


Fig. 7 Spectrophotometric recordings of a 4TBP and *Aspergillus oryzae* tyrosinase (50 U/cm³) mixture at pH 6.0 and 30 °C.

マッシュルームチロシナーゼでは過酸化水素を添加することでキノン酸化が起きたのに対し、麹菌チロシナーゼでは過酸化水素を加えることなく4TBPに対して酵素活性を示すことがわかった。マッシュルームチロシナーゼに対して詳細に報告にされている触媒機構から考察すると、麹菌チロシナーゼは、4TBPに対する触媒効果をもつoxy型チロシナーゼ分子を多く有すると考えられる⁴⁾。種々のフェノール系化合物に対して麹菌チロシナーゼとキトサンビーズを併用して除去効果を検討した結果を表2にまとめた。p-クレゾール、炭素数4つまでの直鎖状アルキルフェノール及びp-クロロフェノールに対してほぼ100%の除去率が得られ、高い除去効果を示したとともに4TBPに対して長い反応時間を要するが、過酸化水素を添加しないで90%の吸着率を示した。

Table 2 Removal of various phenol compounds by *Aspergillus oryzae* tyrosinase-oxidation (50 U/cm³) and subsequent adsorption on the chitosan beads (0.025 cm³/cm³) at 30 °C and pH 6.0.

Phenol compound	Conversion (%)	Adsorption (%)	Removal (%)	Removal time (min)
<i>p</i> -cresol	100	98.7	98.7	70
<i>m</i> -cresol	72.2	100	72.2	780
4EP	100	100	100	120
4NPP	100	100	100	110
4NBP	100	100	100	90
4TBP	92.8	100	92.8	900
catechol	74.5	100	74.5	60
<i>p</i> -chlorophenol	99.4	100	99.4	100

4 結論

マッシュルームチロシナーゼとキトサンビーズを併用したフェノール系化合物の吸着除去を検討した結果、p-クレゾールにおいて決定した至適条件であるpH7.0、45°Cで種々のアルキル及びクロロフェノールに対して高い除去率を示した。また、麹菌チロシナーゼの至適条件をpH6.0、30°Cと決定でき、アルキルフェノールに対して高い除去率を示した。さらに、マッシュルームチロシナーゼでは過酸化水素を添加することで酵素反応を示す4TBPに対して麹菌チロシナーゼは過酸化水素無添加で酵素反応を示し、吸着除去できることがわかった。

本研究において種々のフェノール系化合物に対してチロシナーゼとキトサンビーズの併用による除去法が構築できたので、今後は現在除去が求められている炭素数の長いアルキルフェノールやハロゲン化フェノールなどの吸着除去を検討するとともに、両チロシナーゼの固定化による反復利用を検討し、本法の汎用化と高機能化を目指す。

【参考文献】

- 1) G. Kumar, J. F. Bristow, P. J. Smith, G. F. Payne, *Polymer*, 41, 2157 (2000).
- 2) S. Wada, H. Ichikawa, K. Tatsumi, *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 304 (1995).
- 3) H. Obata, H. Ishida, Y. Hata, A. Kawato, Y. Abe, T. Akao, O. Akita, E. Ichishima, *J. Biosci. Bioeng.*, 97, 400 (2004).
- 4) M. Jimenez, F. Garcia-Carmona, *Biochim. Biophys. Acta*, 1297, 33 (1996).