

# 酵素固定化技術の開発と環境浄化システムへの応用

日大生産工 ○山田和典・柏田 歩・松田清美・平田光男

## 1. 結論

近年、合成化学物質の自然界への流入による動植物やヒトの健康への影響が懸念され、環境保全に対する関心も高まっている。フェノール化合物は環境汚染物質の1つであり、石油精製、樹脂製造、製紙などの工場およびその関連施設からの排出が考えられ、この中には発ガン性の高いものも含まれている(1)。オクチルフェノールやニルフェノールなどのアルキルフェノールなどが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)の分解によって生成することも知られている。さらに、ポリカーボネートやエポキシ樹脂の合成原料として使われているビスフェノールA(2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン)(BPA)が加工製品材料の加熱処理による溶出や埋め立てごみ廃棄場から浸出するという報告もある(2)。アルキルフェノールやBPAなどのフェノール化合物は動物やヒトの内分泌系をかく乱する可能性がある化学物質とされ、鳥類の卵殻薄化、魚介類の雌化、免疫機能の低下などの影響が報告されている。また、これらの化合物は、環境中で分解されにくい、食物連鎖によって魚類、両生類、哺乳類などの水棲動物中で高く濃縮されることも指摘されている(2,3)。

これらフェノール化合物の分解や除去法として活性炭やゼオライトへの吸着、膜分離、電気分解、光酸化などの化学的処理法や微細藻類や細菌を使った生物学的処理法が報告されているが、副生成物の生成や未反応成分の残存、また方法によっては設備の大型化や低効率といった運用面での問題もある。

我々はこれらの化合物を分解するまたは反応性の高い別の化学種に変換できる酸化還元酵素に着目し、*p*-アルキルフェノールをキノン酸化するチロシナーゼ(4)や過酸化水素存在下でフェノール化合物をラジカル化するペルオキシダーゼ(5,6)を用いた。今年度はこれらの酸化還元酵素を使った効率的な除去条件の確立と実用的応用への構築を検討した。

## 2. 酸化還元酵素を使ったビスフェノールAの除去と固定化への応用

平成19年度は、①マッシュルームチロシナーゼによるBPAおよびその誘導体(7)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)、②過酸化水素存在下での西洋ワサビペルオキシダーゼによるBPAのラジカル化とカップリング反応による不溶性オリゴマーの形成を利用した沈殿除去とビスフェノール誘導体の除去への応用(9,10)、③マッシュルームチロシナーゼのイオン交換樹脂への固定化と固定化チロシナーゼを用いた*p*-アルキルフェノールの除去(11,12)に関する研究を行った。

### 2. 1 マッシュルームチロシナーゼによるビスフェノールAの除去

Sigma社製のマッシュルームチロシナーゼ(EC 1.14.18.1, 比活性: 2590U/mg)を用いてBPAを対象物質とした過酸化水素存在下でのキノン酸化と至適条件を検討した上で、キトサンビーズへのキノン吸着による除去を行った。

BPA溶液にチロシナーゼを加えると、徐々にではあるがキノン酸化が進行し、過酸化水素を加えるとキノン酸化はさらに加速した。キノン酸化は過酸化水素濃度が高いほど顕著に進行し、0.3~0.4mMで最大となった。これは過酸化水素の添加に伴うチロシナーゼの形体変化によって説明できる。チロシナーゼには3つの形体があるが、ほとんどはmettyrosinase (Emet体)として存在する。しかし、過酸化水素の存在下ではEmet体はoxytyrosinase体に変化されてキノン酸化を加速すると考えられている。さらに、pHと温度依存性を検討した結果、pH6.0~7.0、40°Cを至適条件と決定できた。

pH6.0、40°Cでキトサンビーズ量を変化させた際の吸光度の変化(酵素濃度: 200U/cm<sup>3</sup>)を図1に示す。キトサンビーズを加えることによって吸光度の上昇が著しく抑えられ、キトサンビーズ量0.050 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>では30分で吸光度はほぼゼロとなり、酵素反応によって形成したキノン化合物をほぼ除去でき、HPLC測定から残留する未反応のBPAが観察されなかったことから、BPAがキノン酸化とキトサンへのキノン吸着を介して除去できたことがわかった。また、キトサンビーズ量を増加させるとより短時間で

除去でき、BPAのキノン酸化が速くなることがわかった。さらに、BPAの除去において決定さ

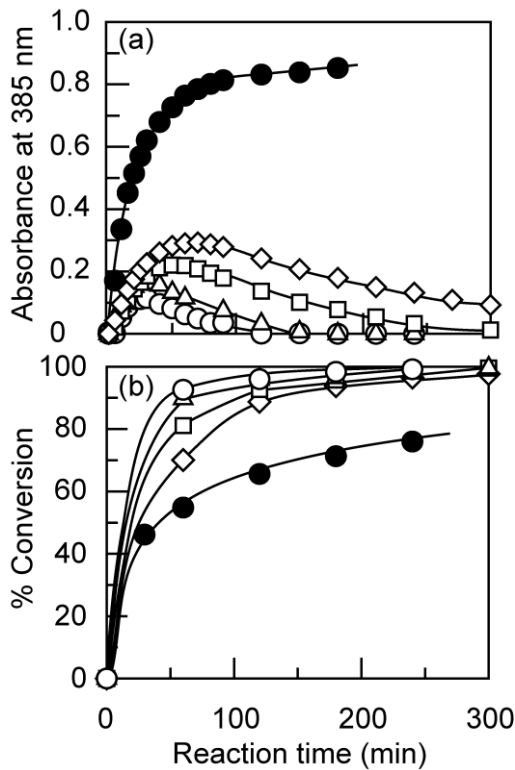


Figure 1 Removal of BPA (0.3 mM) by combined use of mushroom tyrosinase (200U/cm<sup>3</sup>) and chitosan beads (●: without, ◇: 0.025, □: 0.050, △: 0.100, ○: 0.150 (cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>)) in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 mM) at pH 6.0 and 40°C.

れた至適条件を利用して数種のビスフェノール誘導体を除去できることも明らかとなった。

## 2.2 ペルオキシダーゼによるBPAおよびその誘導体の除去

Sigma (株)から購入した西洋ワサビペルオキシダーゼ (E.C 1.11.1.7, 224U/mg-solid)を使用した。実験は、まずBPAを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(8), 種々のビスフェノール誘導体の除去に応用した。pH6.0のBPA溶液(0.4mM)に西洋ワサビペルオキシダーゼ, 分子量  $1.0 \times 10^4$  のポリエチレングリコール(10K-PEG), 過酸化水素を加えることによって酵素反応を開始させ(溶液中でのBPAの濃度: 0.3mM), 所定時間ごとに濁度を測定するとともに残留BPA濃度をHPLC法によって測定した。

西洋ワサビペルオキシダーゼは過酸化水素存在下でフェノール化合物をラジカル化し, 形

成したフェノキシラジカルのカップリング反応による水不溶性オリゴマーの形成によって沈殿を形成することが明らかとなっている。まず, 西洋ワサビペルオキシダーゼの酵素活性によってBPAは過酸化水素存在下でラジカル化とカップリング反応を繰り返しながら高分子化することによって, 水不溶性オリゴマーが形成することがわかった。さらに, 至適条件を検討した結果, 残留率は過酸化水素濃度の上昇とともに低下し, [BPA]/[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=1.0 (BPA濃度: 0.3mM)の条件でBPAが完全に処理された。ペルオキシダーゼの触媒作用は過酸化水素存在下で進行し, 低濃度ではBPAの他にカップリング反応によって形成した2または4量体のような中間体をラジカル化する際にも過酸化水素が消費されるため不足し, 逆に過酸化水素が過剰に存在すると, ペルオキシダーゼの一部が不活性な形態となって活性が低下する(13)。また, 反応溶液中にポリエチレングリコール(PEG)を加えると, 酵素の活性が保持され, BPAの処理時間を短縮することができた。これは酵素反応によって形成したラジカルによる酵素の失活や不溶性オリゴマーへの包括などが抑えられるためと考えられる(14)。さらに, 0.3mMのBPAの処理条件で検討した結果, pH6.0, 30°C, [BPA]/[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=1.0 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度: 0.3mM), [HRP]=0.1U/cm<sup>3</sup>, [10K-PEG]=0.1 mg/cm<sup>3</sup>を至適条件と決定できた。

また, 近年, 特殊ポリカーボネートやエポキシ樹脂の合成や高機能化を目的として需要が増加しつつある種々のビスフェノール誘導体を対象に除去実験を行った結果を表1にまとめた。10U/cm<sup>3</sup>まで濃度を上昇させても転化率が約40%程度に留まったビスフェノールSと2,4'-ジヒドロキシジフェニルスルホンを除いて他の11種類のビスフェノール誘導体に対しては, 活性が低く酵素濃度を上昇させる必要があるものもあったが, いずれもほぼ完全に処理することができた。また, 酵素反応後の溶液のpHを塩酸で4.0まで低下させると, 形成した不溶性オリゴマーの凝集によって容易にろ別できるようになり, 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処理でき, また酵素処理後の溶液のpH調整によって不溶性オリゴマーを容易に分別除去することがわかった。

## 2.3 固定化チロシナーゼの反復利用とp-アルキルフェノールの除去への応用

上述したチロシナーゼやペルオキシダーゼを

用いたアルキルフェノールや BPA の除去に関する研究で、酵素の触媒機能を反復して利用す

ノン吸着が上昇し、除去率の低下が抑えられ、固定化チロシナーゼの活性の低下を効果的に

Table 1 Removal of BPA and its derivatives by horseradish peroxidase in the presence of 10K-PEG (0.10mg/cm<sup>3</sup>) at pH 6.0 and 30 °C.

Bisphenol derivatives	[HRP] (U/cm <sup>3</sup> )	Reaction time (min)	Residual %	Color of precipitates
bisphenol A	0.1	120	0	white
bisphenol B	0.03	90	0	yellowish white
bisphenol C (0.05mM)	0.01	60	0	orange
bisphenol E	0.1	120	0.5	ocher
bisphenol F	0.5	120	2.6	gray
bisphenol S	10	120	48.7	brown
bisphenol T	0.1	120	0.2	yellowish white
bisphenol Z (0.01mM)	0.05	60	0	white
diphenolic acid	0.5	60	0.3	white
4,4'-dihydroxydiphenyl ether	0.001	60	0	pink
2,4'-dihydroxydiphenylmethane	0.1	120	0.5	ocher
2,4'-dihydroxydiphenylsulfone	10	120	28.7	brown
4,4'-dihydroxybenzophenone	0.5	90	0.3	white
2,4'-dihydroxybenzophenone	1.5	120	0.2	yellowish white

るには、不溶性の担体への固定化などの手段が必要であり、ここではマッシュルームチロシナーゼの固定化担体としてアクリル酸系弱酸性イオン交換樹脂 DAIAION, WK10(三菱化学(株), 粒径: 300~1180 $\mu$ m, イオン交換容量: 2.5 mmol/cm<sup>3</sup>)に共有結合を介した固定化を行った。

濃度 2000U/cm<sup>3</sup> のチロシナーゼ溶液にイオン交換樹脂 0.5cm<sup>3</sup> を加えた後、水溶性カルボジイミドの 1 種である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 0.333mmol を溶解させた pH7.0 の緩衝溶液を滴下し、4 °C で所定時間攪拌した。反応後、チロシナーゼを固定化したイオン交換樹脂は緩衝溶液で洗浄し、4 °C で保存した。内径 5.0mm のカラム 2 本の一方にチロシナーゼ固定化イオン交換樹脂 0.5cm<sup>3</sup> を、もう一方に市販のキトサンビーズを所定量充填した。

45°C, pH7.0 で対象溶液である 0.5mM の *p*-クレゾール溶液 20cm<sup>3</sup> を 3 回循環させ(1 回の除去実験), この除去実験を 5 回繰り返した結果, 固定化時間 72 時間で調製したチロシナーゼ固定化樹脂を用いると, *p*-クレゾールをほぼ除去できた。この際, *p*-クレゾール溶液は 2 本のカラムを約 30 分で通過し, 1 回の除去実験に 90 分の時間を要した。また, 5 回の除去実験を繰り返した際の除去率は 95% 以上でほぼ一定となり, 共有結合を介したイオン交換樹脂への固定化によりチロシナーゼの酵素活性を反復利用できることがわかった。キトサンビーズの充填量を増加させるとキトサンビーズによるキ

抑えるには 4.0cm<sup>3</sup> のキトサンビーズが必要であった。しかし, *p*-クレゾール溶液がカラムを通過する時間が長いと, 固定化チロシナーゼの活性を低下させることになるので, 粒径の大きい架橋キトサンビーズを作成した。

キトサン 500(和光純薬(株))を 2.0wt% に溶解した酢酸水溶液(濃度: 1wt%)10cm<sup>3</sup> をビュレットで 1wt% のトリポリリン酸ナトリウム(TPP)溶液中に滴下することで得られたキトサンビーズをエピクロロヒドリン 15mmol を含む 1M の NaOH 水溶液に移し, 75°C で 24 時間攪拌しながら加熱することで架橋キトサンビーズを調

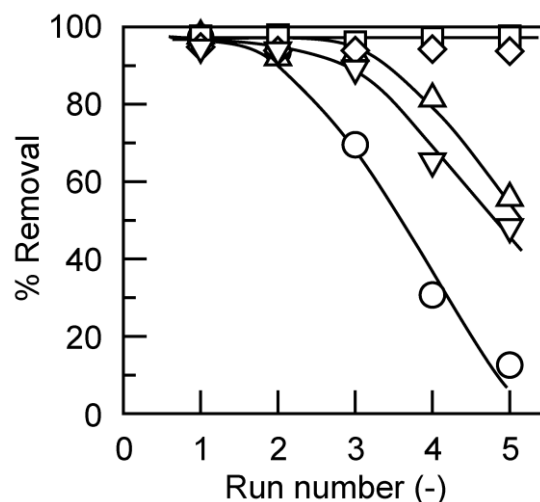


Figure 2 Reusability of mushroom tyrosinase immobilized on an anion-exchange resin, DAIAION WK 10, for removal of *p*-cresol at pH 5.0 (○), 6.0 (△), 7.0 (□), 10.0 (◇), and 11.0 (▽) at 45 °C. Average immobilized amount =2.81 mg/cm<sup>3</sup>. Amount of packed chemically crosslinked chitosan beads=5.0cm<sup>3</sup>.

製した。キノン化合物はキトサンのアミノ基と反応するので、ここではキトサン中のアミノ基を TPP で保護し、 $-CH_2OH$  と  $-OH$  基を利用した架橋反応を行った。

架橋キトサンビーズを内径 8.0mm のカラムに充填し、上記と同様の手順で除去実験を行った。作成した架橋キトサンビーズの粒径は 2.0~2.8mm であり、チロシナーゼ固定化樹脂量を  $0.5\text{cm}^3$  として架橋キトサンビーズを用いて除去実験を行った結果、 $5.0\text{cm}^3$  の架橋キトサンビーズを充填すると 90%以上の除去率が得られ、処理時間を約 70分に短縮できた。

さらに、 $5.0\text{cm}^3$  の架橋キトサンビーズを用いて除去率の温度と pH 依存性を検討した結果、固定化していないチロシナーゼの至適 pH である 7.0 では  $50^\circ\text{C}$  までの範囲で反復利用が可能となったが、 $60^\circ\text{C}$  では固定化チロシナーゼの熱変性によって除去率が徐々に低下した。また、pH を変化させた場合、**図 2** に示すように固定化していないチロシナーゼの至適 pH より高い pH8.0 や 9.0 で固定化チロシナーゼを繰り返し利用できるようになり、利用できる pH 範囲を広げることができた。これらの結果から、pH7.0~9.0、 $50^\circ\text{C}$  以下で固定化チロシナーゼを繰り返し利用することができ、固定化によって酵素の pH と熱安定性が向上したことがわかった。また、4-イソプロピルフェノール、4-sec-ブチルフェノール、4-オクチルフェノール、4-ノニルフェノールなどの内分泌かく乱懸念物質とされるアルキルフェノールも本方法によって除去できた。

### 3. 結論

酵素がもつ生体触媒機能を利用した環境汚染物質の除去と水質浄化を目的とした一連の研究の中で、マッシュルームと麴菌由来のチロシナーゼや西洋ワサビと大豆由来のペルオキシダーゼを使い、アルキルフェノール、ビスフェノール A 及びその誘導体を除去することができた。また、固定化と酵素の反復利用に関する点では、マッシュルームチロシナーゼのイオン交換樹脂への固定化を行い、至適固定化条件の決定と固定化酵素の反復利用性を評価できたので、今後は種々の直鎖状および分岐状アルキルフェノールの除去へ展開させるとともに、固定化チロシナーゼの安定性と再利用性をさらに向上させ、低 pH やより高温での反復利用の研究を続ける。しかし、固定化量が高すぎると、固定化した酵素分子が緻密化し、活性が低下するなどの問題もあり、実際の反復利用性を

考えると、イオン交換樹脂よりも親水化処理した PE 板やフィルムへの固定化を行った方が経済的かつ合理的な処理技術であるといえ、今後の研究方向の 1 つといえるだろう。つまり、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できる。

### 4 参考文献

- 1) Guillet, L. J., Gunderson, M. P., *Reproduct.*, **122**, 857-864 (2001).
- 2) 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).
- 3) Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A. G. M., Bowmer, T., *Aqua. Toxicol.*, **43**, 77-92 (1998).
- 4) Sun, W. Q., Payne, G. F., *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 79-86 (1996).
- 5) Ikehata, K., Buchanan, I. D., Smith, D. W., *J. Environ. Eng. Sci.*, **2**, 463-472 (2003).
- 6) Ghiourelis, M., Nicell, J. A., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **75**, 98-106 (2000).
- 7) 杉山立樹, 武蔵絵里子, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 山田和典, 高分子論文集, **65**, 108-111 (2008).
- 8) Yamada, K., Inoue, T., Akiba, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2467-2475 (2006).
- 9) Yamada, K., Ikeda, N., Takano, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Prep. of Expand. Abst. of Environ. Chem., in 234th ACS Meeting*, **48**(2), 94-98 (2006).
- 10) Yamada, K., Shibuya, T., Noda, M., Uchiyama, N., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2503-2510 (2007).
- 11) 山田和典, 市村葉子, 西健次郎, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 第 21 回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集, p114-115 (2007).
- 12) 佐藤えりか, 田村鮎美, 川越潤一, 市村葉子, 西健次郎, 山田和典, 高分子論文集, **65**, 104-107 (2008).
- 13) Jiménez, M., and Carcía-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33-39 (1996).
- 14) Duarte-Vázquez, M. A., Ortega-Tovar, M. A., García-Almendarez, B. E., Regalado, C., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 42-47 (2002).