

チロシナーゼとキトサンビーズによるフェノール系化合物の吸着除去

日大生産工(院) ○秋葉 勇志
月桂冠(株)総研 秦 洋二・中村 幸宏
日大生産工 平田 光男・柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

水質汚染物質であるフェノール系化合物は製油、製鉄、染料工場など多くの工業分野からの廃水中に含まれ、体内へ混入すると中枢神経障害や肝障害を起こす恐れがあり、接触によっては皮膚炎を起こすこともある。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することで異臭を発するので、フェノール系化合物を廃水中から除去する簡易的な方法を確認することは急務である。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、いずれも高コストや設備の大型化などの問題がある。本研究では上記の方法より低コストで簡易的な方法として酵素反応を利用したフェノール系化合物の除去法の構築を目指した。

多くのフェノール系化合物は酸化還元酵素の一種であるチロシナーゼ(EC1.14.18.1)によりキノン酸化され^{1,2)}、キトサンやポリエチレンジイミンなどのカチオン性高分子の添加により凝集するが³⁾、添加量の多すぎるまたは少なすぎると凝集効果が著しく低下する。本研究では、酵素反応によって生成したキノン化合物を多孔質なキトサンビーズ(キトパール(富士紡績(株)))に吸着することで反応系内からの効率的な除去を目指した。

【実験】

＜酵素活性及び吸着測定＞

pH7.0の緩衝溶液を用いて調製した100U/cm³のmushroomチロシナーゼ(Sigma Aldrich(株)製)溶液と1.0mMの*p*-クレゾール溶液それぞれ10cm³を45℃で混合させ、所定時間ごとに混合緩衝溶液のUV-visibleスペクトルを測定した。また、両溶液を混合すると同時にキトサンビーズを添加し、同様にUV-visibleスペクトルを測定した。

更に、麹菌チロシナーゼ(月桂冠(株)製)を用い、

同様に酵素活性測定を行った。

＜残留フェノール系化合物濃度の定量＞

反応時間60分で採取した混合緩衝溶液0.2～0.4cm³に濃度20.4mMの4-アミノアンチピリン(以下4AA)溶液と83.4mMのフェリシアン化カリウム溶液をそれぞれ0.2cm³ずつ添加した後NaHCO₃溶液3.0cm³で希釈し、波長500nm付近での吸光度測定によりフェノール系化合物の残留濃度を求めた。また、4AA法で発色しないフェノール系化合物では高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC)を利用して残留濃度を決定した。

【結果および考察】

＜mushroomチロシナーゼによるフェノール系化合物の吸着除去＞

pH7.0, 45℃で*p*-クレゾール+mushroomチロシナーゼ混合溶液の反応時間に対する波長400nmでの吸光度変化(○)をキトサンビーズ(反応溶液20cm³に対して0.5cm³)を添加した場合(△)と併せて図1に示す。キトサンビーズを添加していない系では反応時間9分までキノン化合物の生成を示す波長400nmの吸光度は上昇した後、一定になった。キトサンビーズを加えた系では反応時間5分以降で吸光度は徐々に低下した。キトサンビーズを添加することによって吸光度が顕著に低下したことから、キトサンビーズが酵素反応によって生成したキノン化合物を吸着したことがわかる。キトサンビーズ無添加時に生成したキノン化合物の生成量を基準とした吸着率は92.9%となった。種々のフェノール系化合物において反応時間60分での残留濃度から算出した転化率、吸着率及び除去率を表1にまとめた⁴⁾。HPLCによる定量から*p*-クレゾールのキノンへの転化率は100%であったので、除去率は92.9%となった。また、H₂O₂存在下で酵素反応を示す4-*tert*-ブチルフェノールにおいてもキトサンビーズの添加量を増加させることで除去率を上昇させることができた。これはキトサンビーズへの添加量を増加させたことでキノン化

Adsorption and Removal of Phenol Compounds with Tyrosinase and Chitosan Beads

Yuji AKIBA, Yoji HATA, Yukihiro NAKAMURA, Mitsuo HIRATA,
Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA and Kazunori YAMADA

合物の吸着が高く起こると、反応系内のキノン化合物濃度が減少し、キノン化合物への転化が促進したためと考えられる。

以上のことから、mushroomチロシナーゼとキトサンビーズを併用することで種々のフェノール系化合物を効率良く吸着除去できることがわかった。

＜麹菌チロシナーゼによるフェノール系化合物の吸着除去＞

pH6.0、25℃で*p*-クレゾール+麹菌チロシナーゼ混合溶液へのキトサンビーズ添加量を変化させた際の反応時間に対する400nmの吸光度変化を図2に示す。麹菌チロシナーゼはmushroomチロシナーゼの至適温度である45℃では、活性が低下するので、ここでは温度を25℃に下げて実験を行った。キトサンビーズを添加していない系では波長400nmでの吸光度は上昇し、90分でほぼ一定になった。キトサンビーズを0.5cm³添加すると、反応時間30分以降で吸光度は徐々に低下し、反応時間240分でのキノン吸着率は93.8%となった。この値はmushroomチロシナーゼを用いたときとほぼ同等の値である。また、添加したキトサンビーズ量を1.0、1.5cm³と増加させることで、それぞれ反応時間120分で94.6%、100分で95.9%の吸着率が得られ、より短時間でキノン化合物を吸着できることが明らかになった。

以上の結果からmushroomチロシナーゼとキトサンビーズを併用することで種々のフェノール系化合物を吸着除去できることを明らかにした。また、麹菌チロシナーゼを用いてもmushroomチロシナーゼと同様に*p*-クレゾールを吸着除去できることがわかったので、今後pHや温度などの至適条件を決定しながら、種々のフェノール系化合物に対して吸着時間の短縮と吸着量の上昇を検討する予定である。

【参考文献】

- 1) G. Kumar, P. J. Smith, G. F. Payne, *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 154 (1999).
- 2) G. Kumar, J. F. Bristow, P. J. Smith, G. F. Payne, *Polymer*, **41**, 2157(2000).
- 3) S. Wada, H. Ichikawa, K. Tatsumi, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 304 (1995).
- 4) 山田和典, 平田光男, 秋葉勇志, 特願, 2003-317368.

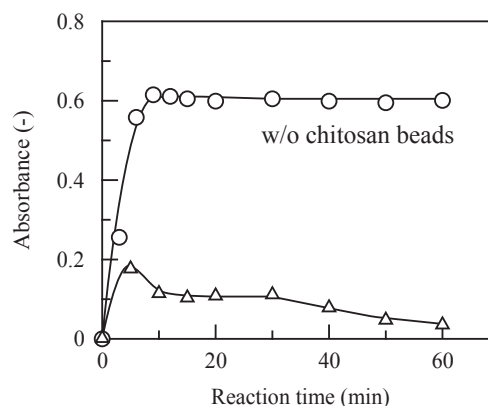


Figure 1 Changes in the absorbance at 400 nm of the *p*-cresol and mushroom tyrosinase mixtures with 0.5 cm³ of chitosan beads (△) with the reaction time at pH 7.0 and 45 °C.

Mushroom tyrosinase concentration : 50 U/cm³

Table 1 Removal of phenol compounds through enzymatic oxidation at pH 7.0 and 45 °C for mushroom tyrosinase.

Substrate	Bead volume (cm ³)	Conversion (%)	Adsorption (%)	Removal (%)
<i>p</i> -cresol	0.5	100	92.9	92.9
<i>m</i> -cresol	0.5	97.6	86.2	84.1
4-ethylphenol	0.5	100	94.6	94.6
4- <i>n</i> -propylphenol	0.5	100	93.7	93.7
4- <i>n</i> -butylphenol	0.5	99.6	97.9	97.5
4- <i>tert</i> -butylphenol ^{a)}	0.5	49.0	15.9	7.79
	2.5	58.0	56.8	32.9
<i>p</i> -chlorophenol	0.5	99.2	99.0	98.2
<i>m</i> -chlorophenol	0.5	72.0	98.3	70.8

a) The pH value was adjusted to 6.0 in the presence of hydrogen peroxide of 0.5 mM.

Substrate concentration : 0.5 mM

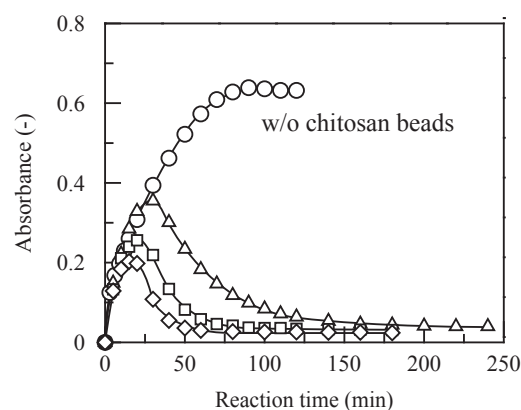


Figure 2 Changes in the absorbance at 400 nm of the *p*-cresol and koji (*Aspergillus oryzae*) tyrosinase mixtures with 0.5 (△), 1.0 (□), and 1.5 cm³ of chitosan beads with the reaction time at pH 6.0 and 25 °C. koji (*Aspergillus oryzae*) tyrosinase : 50 U/cm³