

# ペルオキシダーゼによるフェノール系化合物の重合とその除去

日大生産工(院) ○渋谷 崇志  
日大生産工 山田 和典

## 【緒言】

酵素は、生態環境に近い温度、pHで効率的に触媒作用を引き起こし、日用品から医薬品に至るまで多岐にわたり利用されている<sup>1)</sup>。水質汚染物質のひとつであるフェノール系化合物は過酸化水素(以下H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)存在下で酸化還元酵素の1種であるペルオキシダーゼ(EC1.11.1.7)によりラジカル化され、さらに水不溶性の重合体を形成するという報告がある<sup>2)</sup>。さらに、ポリエチレングリコール(以下PEG)を添加すると酵素の安定性が増して活性が向上する<sup>3)</sup>。

本研究では、フェノール系化合物をペルオキシダーゼによって除去する際のpHや温度に加えてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とPEG濃度の依存性を検討するとともに、本法の種々のフェノール系化合物への応用を目指す。

## 【実験】

ペルオキシダーゼ(Aldrich製, highly stabilized, from horseradish, P2088)の比活性は269U/cm<sup>3</sup>であり、市販品をそのまま使用した。pH5.0~8.0のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いてペルオキシダーゼ(2.0U/cm<sup>3</sup>)、*p*-クロロフェノール(5.0mM)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(20mM)及びPEG(M=1.0×10<sup>4</sup>, 1.0mg/cm<sup>3</sup>)溶液を調製した。反応系内で*p*-クロロフェノール、PEG、ペルオキシダーゼ濃度がそれぞれ2.5mM, 0.075mg/cm<sup>3</sup>, 0.1U/cm<sup>3</sup>となるように各溶液を混合した後、温度30℃で2.5mMとなるようにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液を加えて反応を開始させ、濁度、残留フェノール濃度、UV-visibleスペクトルを経時的に測定した。

### <濁度の測定>

所定時間ごとに反応系から溶液約3.6cm<sup>3</sup>を採取し、波長600nmでの吸光度から濁度を算出した。

$$T = 10^{-Abs} \quad \dots(1)$$

$$\tau = \ln T \cdot \frac{1}{l} \quad \dots(2)$$

T ; Transmittance(-), Abs ; Absorbance(-)  
τ ; Turbidity(cm<sup>-1</sup>), l ; Cell length(cm)

### <残留フェノールの定量>

反応系から所定測定時間ごとに採取した溶液0.4cm<sup>3</sup>に濃度100U/cm<sup>3</sup>のカタラーゼ緩衝溶液1.0cm<sup>3</sup>を加えてペルオキシダーゼの酵素活性を停止させた後、ウルトラフィルターユニット(Advantec(株)製, 分画分子量1.0×10<sup>4</sup>)でろ過した。続いて、ろ液0.8cm<sup>3</sup>に20.8mMアミノアンチピリン溶液0.1cm<sup>3</sup>と83.4mMとフェリシアン化カリウム溶液0.1cm<sup>3</sup>を加えて5分間発色させた後、*p*-クロロフェノールの極大吸収波長である波長510nmで吸光度を測定した。

### <UV-visibleスペクトル測定>

反応時間10, 30, 60分で採取した反応溶液を5Cのろ紙で吸引ろ過によって不溶成分をろ別した後、ろ液のUV-visibleスペクトルを190~700nmの範囲で測定した。

## 【結果および考察】

### <濁度の測定>

基質を*p*-クロロフェノールとし、pH5.0~8.0で酵素反応を開始した。波長600nmでの吸光度から求めた濁度の経時変化を図1に示す。pH7.0で最も高い濁度の上昇が見られた。これに対して、pH5.0と6.0では濁度が上昇した後にpH5.0では10分以降で、pH6.0では30分以降で濁度の低下が見られた。これは反応系内でポリマーが沈殿したためであり、濁度の急激な低下は溶液のpHが低いほど顕著であり、ポリマーの凝集、ろ別が容易であると考えられる。また、pH7.5, 8.0での濁度の上昇が小さく、ポリマーの生成が十分に進まなかったことがわかる。

---

Polymerization of Phenol Compounds with Peroxidase and Their Removal

Takashi SHIBUYA and Kazunori YAMADA

#### <残留フェノールの定量>

反応時間10と60分での残留*p*-クロロフェノール量のpHに対する変化を図2に示す。図2より、pH5.0では反応時間10分で約20%の*p*-クロロフェノールが残存した。これに対して、pH6.0~8.0では残留フェノールはほとんど見られなかった。このことより、pH6.0~8.0では反応時間10分以内で全て*p*-クロロフェノールがペルオキシダーゼによってラジカル化されることがわかった。

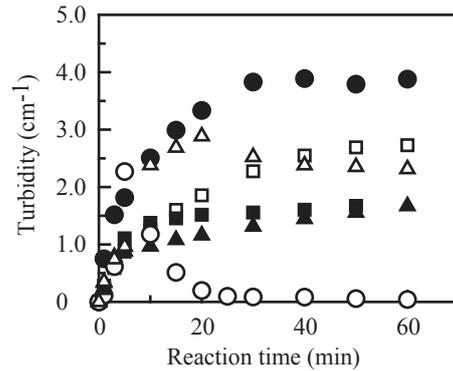
#### <UV spectra測定>

反応時間60分でのろ過後の溶液のUV-visibleスペクトルを図3に示す。図3より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加する前の溶液のスペクトルと比較すると、pH5.0では、200~300nmに未反応の*p*-クロロフェノールと可溶性の反応中間体と考えられるピークが見られ、生成ポリマーをろ別しやすいが、溶液中に未反応分や可溶性な反応中間体が残存することがわかった。また、pH7.0と8.0では、濁度が顕著に上昇しなかったことからわかるように、*p*-クロロフェノールはペルオキシダーゼによってラジカル化されるが、不溶性ポリマーが生成しにくく、可溶性の低分子量オリゴマーの生成に留まっていると考えられる。これに対して、図2と3よりpH6.0では*p*-クロロフェノールのほとんどが10分以内にペルオキシダーゼによってラジカル化されるとともに、溶液中に残存する可溶性中間体も少ないことがわかる。また、pH5.0では270nm以下にpH6.0では見られないピークが存在した。このピークは未反応のピークと類似していることおよび図2の結果から溶液内に残留している*p*-クロロフェノールのピークであると考えられる。

以上の結果からH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下でのペルオキシダーゼによる*p*-クロロフェノールの除去における至適pHは6.0と決定した。また、種々種々のフェノール系化合物への本法の応用を検討する予定である。

#### 【参考文献】

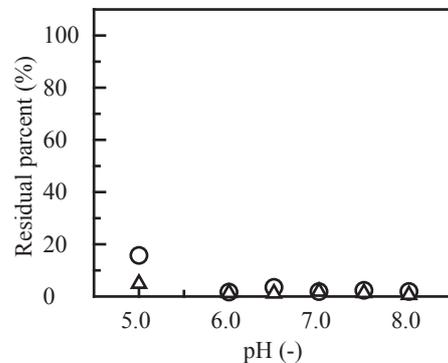
- 1) 藤本 大二郎, “酵素の科学”, 裳華房, p104 (1988).
- 2) J. A. Nicell, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **60**, 204 (1994).
- 3) S. Nakamoto, N. Machida, *Wat. Res.*, **26**, 49 (1992).



**Figure 1** Changes in the turbidity of the mixtures containing *p*-chlorophenol, peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and PEG with the reaction time at 30°C.

pH -

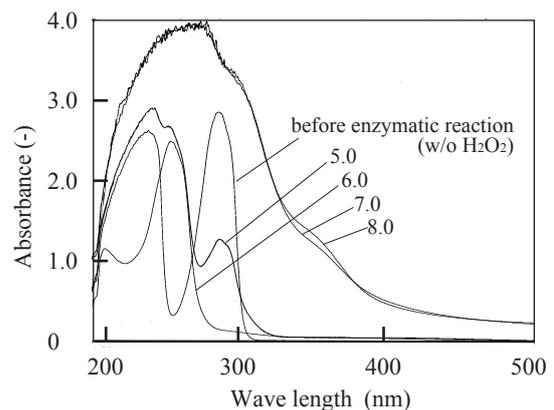
○; 5.0, △; 6.0, □; 6.5, ●; 7.0, ▲; 7.5, ■; 8.0



**Figure 2** Changes in the residual percent of *p*-chlorophenol with the pH value at 30°C.

Reaction time (min) -

○; 10, △; 60



**Figure 3** UV spectra of the buffers containing *p*-chlorophenol, peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and PEG with the pH value after filtration with a 5C filter paper.

Reaction time ; 60min

Temperature ; 30°C