

# ペルオキシダーゼによる水溶液からのフェノール化合物の除去

日大生産工(院) ○渋谷 崇志  
日大生産工 柏田 歩・松田 清美・平田 光男・山田 和典

## 【緒論】

フェノール系化合物は石油精製、鉄鋼、樹脂製造など多くの工業分野に利用されている重要な原料物質であるが、水道水源中に混入すると塩素処理時にクロロフェノールを生成して異臭を発するため、排水基準が定められている。また、フェノール化合物の中にはビスフェノールAやノニルフェノール、オクチルフェノールといった内分泌かく乱作用を有する恐れのある物質があり<sup>1,2)</sup>、廃水中からの除去方法の確立は重要な課題である。現在、活性汚泥法、オゾン酸化法、活性炭吸着法などの除去法が見いだされているが、いずれも高コストや設備の大型化などが問題であるため、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化合物の除去法に着目した。フェノール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であるペルオキシダーゼ(E.C.1.11.1.7)によりラジカル化された後、水不溶性なオリゴマーを形成するので<sup>3)</sup>、ろ過による除去が可能となる。本研究では、種々のアルキルフェノールに対し、ペルオキシダーゼによる効率的な除去系の構築を目的とした。

## 【実験】

ペルオキシダーゼは、Sigma Aldrich製、highly stabilized, from horseradish, P2088, 213U/mgを用いた。pH7.0のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いてアルキルフェノール(5.0mM)、ペルオキシダーゼ(2.0U/cm<sup>3</sup>)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(20mM)およびポリエチレングリコール(以下PEG, M=1.0×10<sup>4</sup>, 1.0mg/cm<sup>3</sup>)溶液を調製した。また、水難溶性な*p-n*-ブチルフェノールと*p-n*-ペンチルフェノールはエタノール+緩衝溶液に溶解させた。アルキルフェノール、ペルオキシダーゼおよびPEGを表1に示す割合で混合した後、30°CでH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液を加えることで反応を開始した(反応系内濃度:アルキルフェノール:2.5mM,

ペルオキシダーゼ:0.10U/cm<sup>3</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:2.5mM, PEG:0.10mg/cm<sup>3</sup>, 全量40cm<sup>3</sup>)。)

Table 1 Preparation of a reaction solution

	Concentration	Volume (cm <sup>3</sup> )
Total volume	-	40
Phenol compound	5.0mM	20
Peroxidase	2.0U/cm <sup>3</sup>	2
PEG (Mw = 1.0 × 10 <sup>4</sup> )	1.0mg/cm <sup>3</sup>	4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20mM	5
Buffer	-	9

## <濁度の測定>

所定時間ごとに反応溶液から約3.6cm<sup>3</sup>を採取し、波長600nmでの吸光度から、(1)式により濁度 $\tau$ を算出した。測定後、溶液は直ちに反応系中に戻した。

$$\tau = -\ln \frac{10^{-\text{Abs}}}{l} \quad (1)$$

$\tau$ : Turbidity (cm<sup>-1</sup>), Abs: Absorbance (-)

$l$ : Cell length (cm)

## <残留フェノールの定量>

所定測定時間ごとに反応溶液から採取した溶液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>)でろ過することにより生成したオリゴマーと酵素を除去した。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>、83.4mMフェリシアン化カリウム溶液0.1cm<sup>3</sup>および0.25M炭酸水素ナトリウム溶液3.0cm<sup>3</sup>を加えて5分間発色させた後、各フェノール化合物の極大吸収波長で吸光度を測定し、初期濃度との関係から残留率を求めた。また、4-AA法で発色しないフェノール化合物は高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC, カラム:GLサイエンス製Inertsil ODS-2, 移動相:純水+アセトニトリル)測定により定量した。

Removal of Phenol Compounds from Aqueous Solutions by Peroxidase

Takashi SHIBUYA, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA,

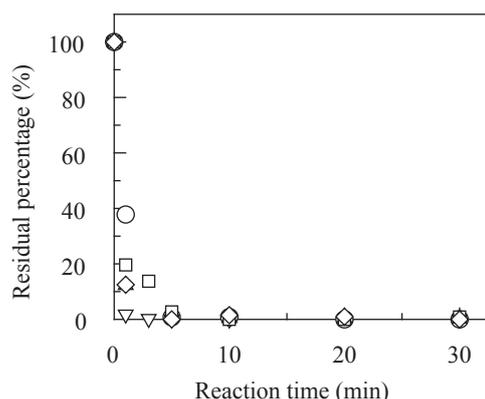
Mitsuo HIRATA and Kazunori YAMADA

### 【結果および考察】

炭素鎖長5までの*p*-アルキルフェノールにおいてpH7.0, 30°Cで表1に示す溶液組成で反応を開始させた。反応時間に対する残留率変化を図1に示す。炭素鎖長5までの*p*-アルキルフェノールは酵素濃度0.10U/cm<sup>3</sup>において30分以内でほぼ完全に酵素酸化され、残留率は0%となった。反応時間に対する濁度変化を図2に示す。いずれのアルキルフェノールにおいても濁度の上昇がみられ、水不溶性なオリゴマーの生成が確認できた。また、*p*-*n*-ブチルフェノール(□, 溶媒: 20%エタノール+緩衝溶液)において他のアルキルフェノールに見られる反応時間の経過ともなう濁度の低下は見られなかった。濁度の低下は反応系内のオリゴマーが凝集沈殿することが原因であり、*p*-ブチルフェノール濃度1.0mMで緩衝溶液のみを溶媒として酵素反応を行ったところ濁度の低下が見られたことから溶媒としてエタノールを加えたためにオリゴマーが凝集しにくくなったためと考えられる。種々のアルキルフェノールにおいて除去率とその系における酵素濃度をまとめて表2に示す。炭素鎖長5までのアルキルフェノールにおいてペルオキシダーゼによりほぼ100%で除去ができることがわかった。*o*-プロピルフェノールでは急激に活性が低下したが、酵素濃度を2.0U/cm<sup>3</sup>にすることで除去率は98%まで上昇した。炭素鎖長にかかわらず*o*-アルキルフェノールは波長400nm付近にピークを持つ可溶性反応中間体を生成するため、*m*-、*p*-アルキルフェノールより除去効率が低下した。しかし、生成した反応中間体はキトサンビーズによる吸着除去が可能であり、キトサンを併用することで効率的な除去ができることを見いだした。今後、*n*-ニルフェノール、*o*-クチルフェノールなどに対してペルオキシダーゼによる除去が可能であるか検討を行う予定である。

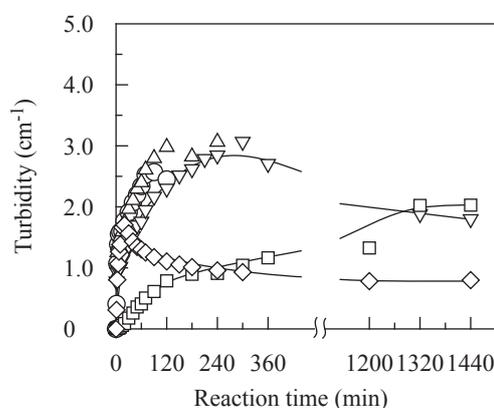
### 【参考文献】

- 1) 藤原 邦達, “恒常性かく乱物質”, 合同出版, p70 (2000).
- 2) 吉田 隆, “環境ホルモン汚染対策”, エヌ・ティー・エス, p335 (1999)
- 3) J.A.Nicell, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **60**, 204 (1994)



**Figure 1** Changes in the residual percentage of *p*-alkylphenols with the reaction time at 30°C.

*p*-alkylphenol -  
 ○:*p*-cresol, △:*p*-ethylphenol, ▽:*p*-propylphenol, □:*p*-*n*-butylphenol, ◇:*p*-*n*-pentylphenol



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

*p*-alkylphenol -  
 The same in Figure1, show in the annotation in Figure 1

**Table 2** Removal of phenol compounds through enzymatic oxidation with peroxidase at 30°C.

Phenol compound	Reaction time (min)	Peroxidase conc. (U/cm <sup>3</sup> )	Removal (%)
<i>o</i> -cresol	60	0.15	94.1
<i>m</i> -cresol	60	0.15	98.1
<i>p</i> -cresol	20	0.10	100
<i>o</i> -ethylphenol	60	0.10	99.0
<i>m</i> -ethylphenol	120	0.15	97.9
<i>p</i> -ethylphenol	30	0.10	99.8
<i>o</i> - <i>n</i> -propylphenol	1380	2.00	98.0
	120	5.00	100
<i>m</i> - <i>n</i> -propylphenol	120	0.20	97.4
	60	0.30	100
<i>p</i> - <i>n</i> -propylphenol	5	0.10	100
<i>p</i> - <i>n</i> -butylphenol <sup>a)</sup>	10	0.10	100
<i>p</i> - <i>n</i> -pentylphenol <sup>b)</sup>	30	0.10	100

a) solvent : ethanol(20%) + buffer

b) solvent : ethanol(30%) + buffer