

マッシュルームチロシナーゼとキトサンを用いたナフトール類の除去

日大生産工(院) ○木村 悠二

日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

染料，医薬品，プラスチック，ゴムおよび合成繊維を生産するための中間体化学薬品であるナフトール類は水生生物に対して強い毒性があるとされている¹⁾。ナフトール類の主な排出要因は，工業排水，産業廃棄物場からの溶出であり，化学的または生物学的な処理法が検討されているが，我々は小規模かつ低コストで行う方法として酵素反応を利用した除去法に着目した。これまでは酸化還元酵素のペルオキシダーゼを用いた沈殿物が形成するラジカル反応の報告であり，チロシナーゼを用いた報告はほとんどない。そこで，本研究では酸化還元酵素の一種で，酸素存在下でクレゾラーゼ活性とカテコラーゼ活性の2段階の酵素活性をもつマッシュルーム由来のチロシナーゼを用いた。マッシュルームチロシナーゼは種々のフェノール化合物をキノン酸化することができ，酵素反応によって形成したキノンはアミノ基と高く反応するため，キトサンビーズへのキノン吸着によって効果的にフェノール化合物を除去できる^{2,3)}。

本研究ではマッシュルームチロシナーゼによって1-ナフトールをキノン酸化させる際のpH，温度，酵素濃度などの至適条件を決定した後，キトサンビーズへのキノン吸着による水溶液中からの1-ナフトールの除去を検討し，さらに本方法を2-ナフトールの除去へ応用した。

【実験】

<試料および溶液調製>

チロシナーゼはSigma社からマッシュルーム由来のものを購入し，その比活性は3960U/mgであった。異なるpHのリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて0.4mMのBPA，50U/cm³のチロシナーゼ溶液を調製した。キトサンビーズ(粒径：70～200μm，比表面積：70～100m²/g，含水量：92.5%)は富士紡績(株)から購入し，緩衝溶液中に保存した。1-ナフトールと2-ナフトールは市販品をそのまま使用した。

<酵素反応によるキノン酸化>

1-ナフトール溶液にチロシナーゼを加えるこ

とによって酵素反応を開始させた。所定時間ごとに反応溶液のUV-visibleスペクトル(190～600nm)を測定し，波長520nmでの吸光度の上昇をキノン形成の尺度とした。pH，温度などの諸条件を変化させて1-ナフトールのキノン酸化における至適条件を決定し，さらにキトサンビーズを加え，キトサンビーズを分散させた。その後，直ちに除去実験を1-ナフトールを対象に行った。<HPLC法による転化率の測定>

反応溶液から採取した溶液0.5cm³を80℃の恒温槽中に10分間浸して酵素を失活させた後，マイクロシリンジを用いて20μm³をHPLCへ注入した。GLサイエンス(株)製のInertsil ODS-3カラムを用いて45%アセトニトリル水溶液を流速1.0cm³/minで送液し，保持時間8.5分でのピーク面積から転化率を求めた。また，2-ナフトールにおいては1-ナフトールと同様の条件で保持時間7.5分でのピーク強度より転化率を求めた。

【結果および考察】

1-ナフトール溶液にチロシナーゼを添加すると1-ナフトールは徐々にキノン酸化され，沈殿物が形成した。遠心分離前後の吸光度から反応開始5分後から沈殿物が形成していることが確認できた。この沈殿物は，酵素反応によって形成したキノンがカップリング反応によってキノンオリゴマーとなり沈殿したためと考えられる。これまでの報告でマッシュルーム由来のチロシナーゼを用いたアルキルフェノールやビスフェノールAのキノン酸化では沈殿物の生成が確認されなかったので，化学構造，溶解性，キノン濃度などに依ると考えられる⁴⁾。

次に，キノン酸化させる際の至適pHについて検討した。各pHにおける反応時間に対する吸光度の変化を図1に示す。pH6.0と7.0においては速い段階で吸光度が一定となったが，pH8.0以降では吸光度が上昇し続けた。各pHに対する初速度と反応時間300分での吸光度，転化率の変化を図2に示す。pH7.0と8.0の初速度はほぼ同じ値を示したが，吸光度，転化率はpH8.0で最大値を示したため，至適pHを8.0と決定した。

Removal of naphthols by combined use of mushroom tyrosinase and chitosan

Yuji KIMURA, Ayumi KASHIWADA,
Kiyomi MATSUDA, and Kazunori YAMADA

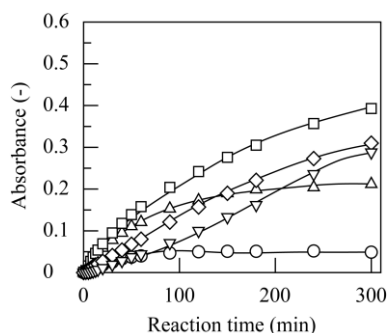


Figure 1 The time course of the absorbance at 520 nm for 1-naphthol (0.30 mM) solutions containing tyrosinase (10 U/cm³) in buffers of pH 6.0 (○), 7.0 (△), 8.0 (□), 9.0 (◇), and 10.0 (▽) at 40°C.

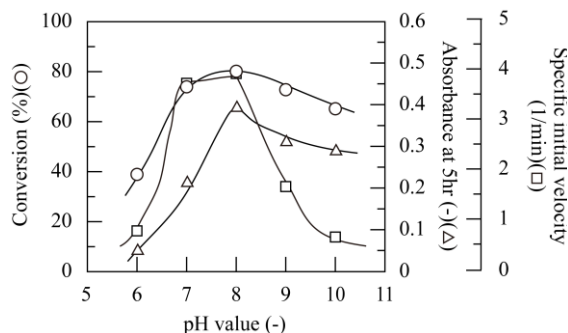


Figure 2 The effect of pH value on tyrosinase-catalyzed (10 U/cm³) quinone oxidation of 1-naphthol (0.3 mM) at 40°C.

次に、この至適 pH で至適温度を検討したところ、40°C で最大値を示したため、至適温度を 40°C と決定した。また、酵素濃度を上げるほど初速度、吸光度、転化率が上昇し、酵素濃度 30U/cm³ では反応時間 300 分で転化率 99%に達した。

その後、1-ナフトール除去における上記の至適条件において 0.10cm³/cm³ のキトサンビーズを添加し除去実験を行った。各酵素濃度における反応時間に対する吸光度の変化を図 3 に示す。吸光度より生成したキノンがキトサンビーズに吸着されることで吸光度が減少した。次に、キトサンビーズ添加と無添加でのチロシナーゼ濃度に対する転化率の変化を図 4 に示す。キトサンビーズ添加により、転化率が上昇し、酵素濃度 20U/cm³ 以上で完全に除去できた。これは、キトサンビーズに生成したキノンが吸着し、溶液中から除去され、酵素反応が促進されたためと考えられる。

さらに、1-ナフトールにおいて決定した至適条件を 2-ナフトールの除去に応用した。1-ナフトールの至適条件では反応時間 300 分では転化率が 26%と低かったので、酵素濃度を上げた結果 300 U/cm³ で反応時間 300 分で転化率 89%に達した。ヒドロキシル基の置換位置が異なることで、酵

素濃度を 10 倍以上上げる必要がある。また、300 U/cm³ で反応時間 30 時間まで延ばすことによって、2-ナフトールを完全に除去できた。

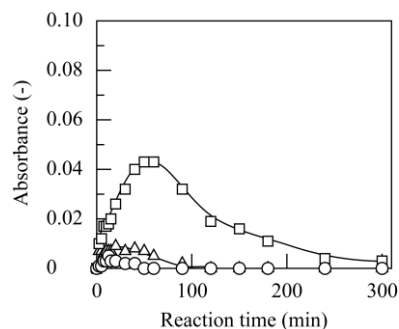


Figure 3 The time course of the absorbance at 520 nm for 1-naphthol (0.30 mM) solutions containing tyrosinase at 10 (○), 20 (△) and 30 (□) U/cm³ in the presence of chitosan beads (0.10 cm³/cm³) at pH 8.0 and 40°C.

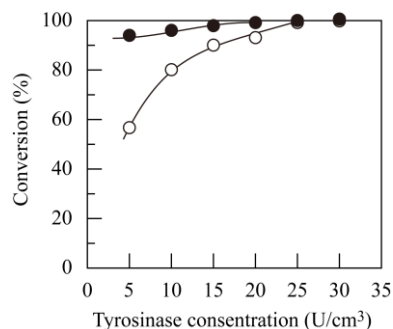


Figure 4 The tyrosinase concentration of conversion value for 1-naphthol (0.30 mM) solutions in the absence (○) and presence (●) of chitosan beads at pH 8.0 and 40°C.

【結論】

上記の結果から、マッシュルーム由来のチロシナーゼを用いて水溶液中からのナフトール類の除去が可能であり、キトサンビーズを併用することで効果的に完全に除去できることが明らかとなった。酵素反応を利用した除去法として応用できると考えられる。

【参考文献】

- 1) N. Aktas, H. Cicek, A. T. Unal, G. Kibarar, N. Kolankaya, A. Tanyolac, *Biores. Technol.*, **80**, 29 (2001).
- 2) M. Jiménez, F. G. Carmona, *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33 (1996).
- 3) K. Yamada, A. Akiba, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823 (2005).
- 4) M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **118**, 721 (2010).