

チロシナーゼとペルオキシダーゼを使った水溶液からの *p*-アルキルフェノールの除去

山田 和典・柏田 歩・松田 清美・平田 光男 (応用分子化学科)

1 緒論

水質汚染物質の1つであるフェノール化合物は、石油精製、樹脂製造、製紙などさまざまな工場から排出され、有毒であるだけでなく、中には発ガン物質として知られているものもある[1]。また、非イオン界面活性剤アルキルフェノールエトキシレートの分解産物であるオクチルフェノールやノニルフェノールなどのアルキルフェノールは内分泌かく乱物質(環境ホルモン)としてあげられ、生態系や人体に悪影響を与える可能性が指摘されている。これらは、生分解性が低いため、環境中に残留し、食物連鎖によって水棲動物(魚類、両生類、哺乳類)に数千から数百万倍に濃縮されたり、体内でエストロゲン受容体と結合してエストロゲン様作用を示すことも知られている[2,3]。

また、ベンゼン環を有するので、酵素によって分解しにくいと言われていたが、チロシナーゼやペルオキシダーゼなどの酸化還元酵素によるアルキルフェノールやクロロフェノールなどの除去に関する研究が近年盛んに行われている。我々は、これまでの研究で①マッシュルーム由来のチロシナーゼにより *p*-アルキルフェノールをキノン酸化させ、生成したキノン化合物をキトサンビーズに吸着させる方法[4]と②過酸化水素存在下で、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼによるアルキルフェノールのフェノキシラジカル化とラジカルカップリング反応を行うことで、不溶性のポリフェノールの重合体を形成させることで沈殿除去する方法[5]を見いだしてきた。

本研究では、上述した2方法によりチロシナーゼとペルオキシダーゼを用いたアルキルフェノールの除去を行うとともに、得られた結果を比較検討した。

2 実験

2.1 チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去

pH7.0のリン酸緩衝溶液を溶媒として濃度 100 U/cm³のチロシナーゼ(Sigma Aldrich, EC 1.14.18.1, 2590U/mg solid)溶液を調製した。和光純薬(株)と東京化成工業(株)製の *p*-アルキルフェ

ノールを緩衝溶液に溶解させ、濃度 1.0mMの溶液を調製した。富士紡績(株)から購入したキトサンビーズ(粒径:70~200nm, 比表面積:70~100m²/g)は予め緩衝溶液中に保存した。*p*-クレゾールを除去する際に決定した至適条件である pH7.0, 45°Cで[4], *p*-アルキルフェノール(0.5mM) + チロシナーゼ(50U/cm³)溶液 20cm³中にキトサンビーズ 0.50cm³を添加した。実験中は、溶液中の *p*-アルキルフェノール残留濃度を逆相カラム Inertsil ODS-2 (5μm, 4.6mmi.d.×15cm)を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法によって求めた。移動相としてアセトニトリル水溶液を用い、アルキル鎖長によって組成を調節した。初期濃度と残留濃度の関係からキノン転化率を求めた。また、キトサンビーズ添加時と無添加時の所定時間ごとの溶液のUV-visibleスペクトルを測定し、生成したキノンのキトサンビーズへの吸着率を求めた。さらに、転化率と吸着率から除去率を求めた。

2.2 ペルオキシダーゼによるアルキルフェノールの除去

Sigma Aldrich製のペルオキシダーゼ(1.11.1.7, 269 U/mg solid)を用いた。pH7.0の緩衝溶液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/cm³)、過酸化水素(20mM)、ポリエチレングリコール(PEG, M.W.=1.0×10⁴, 1.0mg/cm³)溶液を調製した。また、アルキル鎖長4以上の *p*-アルキルフェノールは緩衝溶液に対する溶解性が低いので、緩衝溶液にエタノールを加えて溶解させた。アルキルフェノール 20cm³にペルオキシダーゼ溶液、PEG溶液及び緩衝溶液を混合した後、30°Cで過酸化水素溶液 5 cm³を加えて溶液の全量を 40cm³として反応を開始させた。また、所定時間ごとに溶液を採取し、波長 600nmでの吸光度を測定し、濁度τを算出した。測定後、溶液は直ちに反応溶液に戻した。*p*-アルキルフェノール濃度は上述と同様に HPLC法によって求め、初期濃度との関係から残留率を求めた。

3. 結果および考察

3.1 チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去

p-クレゾール, *p*-エチルフェノール, *p*-*n*-プロピルフェノール, *p*-*n*-ブチルフェノールではチロシナーゼ濃度を $50\text{U}/\text{cm}^3$ としてキトサンビーズ添加量を $0.025\sim 0.050\text{cm}^3/\text{cm}^3$ とすると, 反応時間 60 分で 92.0~97.5% の除去率が得られた[4].

図 1 に *p*-*n*-ペンチルフェノールにおけるチロシナーゼ濃度 $50\text{U}/\text{cm}^3$, キトサンビーズ添加量を $0.025\text{cm}^3/\text{cm}^3$ とした際の反応時間に対する転化率, 吸着率および除去率の変化を示す. キノン転化率は反応時間とともに上昇し, *p*-*n*-ペンチルフェノールは約 10 分でほぼ完全にキノン酸化された. これと同時に生成したキノン化合物がキトサンと反応するので, 吸着率も反応時間とともに上昇した. その結果, 40 分でキノン化合物はキトサンビーズにほぼ吸着され, この時点で除去率が 100% に達した. しかし, アルキル鎖長が 6 以上になると緩衝溶液に対する溶解性が低下するので, 濃度を低下させて実験を行った. 0.5mM の *p*-*n*-ヘキシルフェノールと *p*-*n*-ヘプチルフェノール溶液を緩衝溶液+エタノール混合溶液(*p*-*n*-ヘキシルフェノールではエタノール 20%, *p*-*n*-ヘプチルフェノールではエタノール 30%)を溶媒として調製し, チロシナーゼ濃度 $50\text{U}/\text{cm}^3$, キトサンビーズ添加量 $0.025\text{cm}^3/\text{cm}^3$ で除去実験を行うと, 反応時間 60 分での除去率が *p*-*n*-ヘキシルフェノールでは 71.7%, *p*-*n*-ヘプチルフェノールでは 5.4% と低い値を示した, これは, 反応溶液中に両アルキルフェノールが残存したことを示し, 特に *p*-*n*-ヘプチルフェノールにおいて低い値となった. 除去率の低下はエタノールの添加によるチロシナーゼの失活が原因であると考え, 緩衝溶液を溶媒として 0.3mM の *p*-*n*-ヘキシルフェノールと 0.1mM の *p*-*n*-ヘプチルフェノール溶液を調製し, 同様に実験を行った. いずれも約 20 分でキノン転化され, 除去率も反応時間に対して急激に上昇し, 反応時間 40 分での除去率は *p*-*n*-ヘキシルフェノールでは 100%, *p*-*n*-ヘプチルフェノールでは 98.7% と短時間で高い除去率が得られた.

p-*n*-オクチルフェノールと *p*-*n*-ノニルフェノールではアルキル鎖長がさらに長くなることから, 溶解性がさらに低下し, 0.05mM で実験を行った. *p*-*n*-オクチルフェノールと *p*-*n*-ノニルフェノールにおける反応時間に対する転化率, 吸着率および除去率の変化を図 2 に示す. *p*-*n*-オクチルフェノールはチロシナーゼによって比較的短時間でキノン酸化されたが, 吸着率の上昇は緩やかであった. その結果, 除去率は反応時間 120 分で

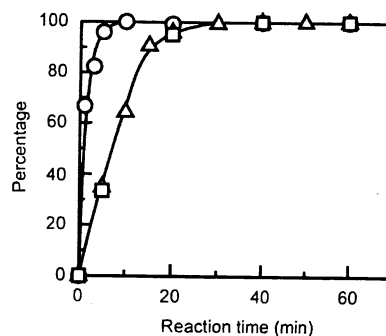


Figure 1 Changes in the % conversion (O), % adsorption (Δ), and % removal (□) with the reaction time for *p*-*n*-pentylphenol.

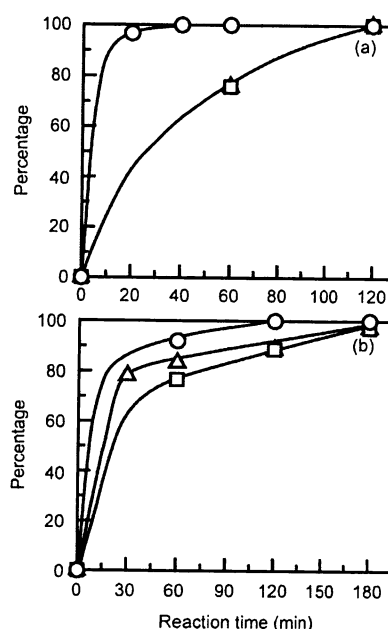


Figure 2 Changes in the % conversion (O), % adsorption (Δ), and % removal (□) with the reaction time for (a) *p*-*n*-pentylphenol and (b) *p*-*n*-nonylphenol.

100%に達した. キノン転化が速く進行していることから, キトサンビーズ添加量を増加させることによってより短時間での除去が可能であると考えられる. *p*-*n*-ノニルフェノールになると, キノン転化率の上昇が緩やかとなり, 完全にキノン酸化させるのに 120 分を要した. また, 生成したキノン化合物のキトサンビーズへの吸着にも長時間を要し, 除去率は反応時間 180 分で 97.2% まで上昇した. *p*-*n*-ノニルフェノールはこれまでの報告において, 安定性が高く, 除去しにくい化合物であることが知られているが, 本方法を利用することで, やや長時間を要するが, 高い除去率が得られたことは 1 つの研究成果であると言える. *p*-*n*-オクチルフェノールと *p*-*n*-ノニルフェノールでは濃度が低く, キノン生成を示す吸光度の上昇が低く, キノン吸着したキトサンビーズの変色も明確に観察できなかったため, キトサンビーズの代わりに

Table1 Removal of *p*-alkylphenols with tyrosinase and chitosan beads at pH7.0 and 45 °C

Phenol compound	Phenol concentration (mM)	Tyrosinase concentration (U/cm ³)	Chitosan beads (cm ³ /cm ³)	Reaction time (min)	% conversion	% adsorption	% removal
4- <i>n</i> -pentylphenol	0.5	50	0.025	60	100	100	100
4- <i>n</i> -hexylphenol	0.3	50	0.025	40	100	100	100
4- <i>n</i> -heptylphenol	0.1	50	0.025	40	100	98.7	98.7
4- <i>n</i> -octylphenol	0.05	50	0.025	120	100	100	100
4- <i>n</i> -nonylphenol	0.05	50	0.025	180	100	97.2	97.2
4-isopropylphenol	0.5	50	0.025	120	99.9	86.7	86.6
4- <i>sec</i> -butylphenol	0.5	50	0.100	120	99.9	93.3	93.2
	0.5	50	0.025	120	95.9	87.5	83.9
	0.5	100	0.100	180	100	98.2	98.2

キトサンフィルムを浸漬させ、同様に酵素反応を開始させた。*p-n*-オクチルフェノールでは 350nm に、*p-n*-ノニルフェノールでは 300nm にピークが観察され、いずれも生成したキノン化合物がキトサンと反応することがわかった。さらに、本法を直鎖以外の *p*-アルキルフェノールに応用した結果、*p*-イソプロピルフェノールと *p-sec*-ブチルフェノールに対して活性を示し、また *p-tert*-ペンチルフェノールに対しては、*p-tert*-ブチルフェノールと同様に [4]pH6.0 において 0.5mM の過酸化水素存在下で活性を示した。これらの結果を表 1 にまとめた。

いくつかの *p*-アルキルフェノールに対しては除去率を上昇させるために酵素濃度とキトサンビーズ添加量を上昇させる必要があるが、90~95%の除去率が得られた。特に本方法は操作方法が簡単であり、キトサンビーズの使用はる別を容易にする。

3. 2 ペルオキシダーゼによるアルキルフェノールの除去

これまでの研究において [5], 2.5mM の *p*-クロロフェノールと *p*-クレゾール溶液に対して、ペルオキシダーゼ濃度：0.10U/cm³, PEG 濃度：0.10mg/cm³, 過酸化水素濃度：2.5mM として除去実験を行うと、酵素反応とラジカルカップリング反応によって不溶性のポリフェノールオリゴマーが生成し、溶液は著しく白濁したと同時に、溶液中の *p*-クロロフェノールと *p*-クレゾールはほぼ除去できたので、上述した条件を至適条件として、ペルオキシダーゼによる *p-n*-アルキルフェノールの除去を行った。

アルキル鎖長 9 までの *p-n*-アルキルフェノールを酵素濃度を 0.10U/cm³ として 30°C で 60 分間反応させた際のアルキル鎖長に対する *p*-アルキルフェノールの残留率を図 3 に示す。アルキル鎖長 6 までの *p-n*-アルキルフェノールは反応時間 60

分以内で完全に酵素酸化され、ポリフェノールオリゴマーの沈殿が形成した。しかし、アルキル鎖長が 7 以上になると、アルキル鎖が長くなるほど残留率は上昇し、*p-n*-ノニルフェノールはほとんど処理されなかった。そこで、ペルオキシダーゼ濃度を上昇させて除去率の向上を目指した結果、*p-n*-ヘプチルフェノールと *p-n*-オクチルフェノールではペルオキシダーゼ濃度を 0.50U/cm³ まで上昇させることによって反応時間 60 分以内に除去することができた。また、これらの *p-n*-アルキルフェノールでは残留率が 0% となった際に形成したポリフェノールオリゴマーの沈殿をろ別後反応溶液の UV-visible スペクトルを測定すると、ポリフェノールオリゴマーを主とする可溶性中間体を示すピークは観察されなかった。このことからこれらの *p-n*-アルキルフェノールがペルオキシダーゼによってフェノキシラジカルとなり、ポリフェノールオリゴマー沈殿物としてろ別されたことが明らかとなった。

p-n-ノニルフェノールの除去におけるペルオキシダーゼ濃度に対する除去率の変化を図 4 に示す。*p-n*-ノニルフェノールはペルオキシダーゼ濃度 10U/cm³ 以下ではほとんど酵素酸化されなかった。ペルオキシダーゼ濃度を 50U/cm³ まで上昇させても反応時間 60 分での除去率は 2% ほどに留まった。このように、*p-n*-アルキルフェノールに対するペルオキシダーゼの活性は、アルキル鎖長が長くなるほど低下し、特に *p-n*-ノニルフェノールに対する活性は著しく低く、他の *p-n*-アルキルフェノールに比べて高いペルオキシダーゼ濃度が必要であった。しかし、50U/cm³ でポリフェノールオリゴマー沈殿物の形成に伴う濁度の上昇が観察されたので、反応時間をさらに延長させたところ、反応時間 24 時間で残留率は 22.5% まで低下し、徐々ではあるがペルオキシダーゼによる *p-n*-ノニルフェノールの酵素酸化が進行していることがわかった。長時間を要するが、約 80%

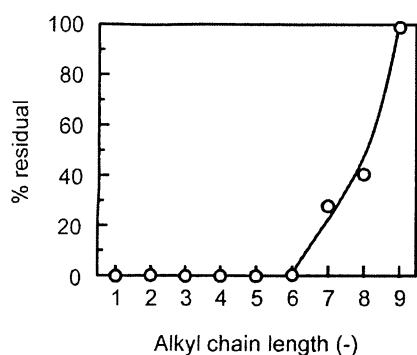


Figure 3 Changes in the % conversion with the carbon chain length of *p-n*-alkylphenol at 60 mins.

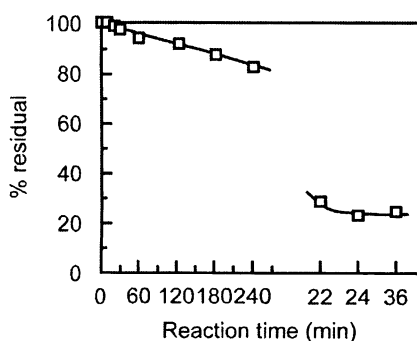


Figure 4 Change in the % residual with the reaction time for *p-n*-nonylphenol at 50 U/cm³.

の *p-n*-ノニルフェノールを除去することができたので、今後さらに反応条件を検討することでより効果的な除去を目指す。ペルオキシダーゼによる種々の *p*-アルキルフェノールの除去の結果をまとめると、低いペルオキシダーゼ濃度(0.10~0.50U/cm³)で除去でき、95~100%の除去率が得られた。

4. まとめ

本研究ではチロシナーゼとペルオキシダーゼによる2種類の *p*-アルキルフェノールの除去法の構築を行ったが、いずれの方法においても至適条件で高い除去率を得ることができた。チロシナーゼによる除去法では、チロシナーゼによって生成したキノン化合物をキトサンビーズに吸着させるので、処理後のろ別が容易であることは操作上重要である。また、ペルオキシダーゼによる除去法では、チロシナーゼを用いた除去法に比べてかなり低い酵素濃度で高い除去率が得られた。ペルオキシダーゼはチロシナーゼに比べて安価であり、低酵素濃度での除去は設備投資の点で重要である。

いずれの方法においても内分泌かく乱物質とされる *p-n*-ノニルフェノールや *p-n*-オクチルフ

エノールを除去できたことは特記すべきことである。今後はビスフェノール A を主としたビスフェノール化合物の除去への本方法の応用を検討するとともに、工業的(実用的)な利用を考える上で、酵素の反復利用は重要な課題であるので、高分子担体への固定化を検討する。この点において、固定化による活性の保持と固定化した酵素の遊離や脱離の抑制は重要であるので、共有結合を介した高分子担体への固定化が次に目指す我々の研究課題である。

5 参考文献

- 1) Guillet, L. J., Gunderson, M. P., Alterations in Development of Reproductive and Endocrine Systems of Wildlife Populations Exposed to Endocrine-disrupting Contaminants, *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., Feminisation of Young Males of the Common Carp, *Cyprinus Carpio*, Exposed to 4-tert-pentylphenol during Sexual Differentiation, *Aqua. Toxicol.*, **43**, 77-92 (1998).
- 4) Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, T., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan beads, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823-829 (2005).
- 5) 渋谷崇志, 柏田 歩, 山田和典, "ペルオキシダーゼによるフェノール系化合物の除去法の構築", 第 54 回高分子討論会, 1Pd186, p2105 (2005).