

# 酵素反応を利用したフェノール化合物の除去と水質浄化への応用

日大生産工 山田 和典, 柏田 歩, 松田 清美, 平田 光男

## 1 緒言

水質汚染物質の1つであるフェノール化合物は、様々な工場排水から排出され、水道水源に混入すると、クロロフェノールを発生させて異臭を発することがある。フェノール化合物の除去は水質汚染防止や環境保全の点からも重要であり、パルス放電処理、活性炭ろ過法、オゾン酸化と活性汚泥処理の併用、液膜法、緑藻・藍藻などの微細藻類の使用といった分解除去法が報告され、実用化に至っているが、いずれも設備の大型化や高コストといった問題があり、低コストで効率的な除去法の構築が必要とされている。

ここでは、従来の方法と比べて簡易的で低コストな除去法として酵素反応を利用した方法を確立することに着目した。フェノール化合物に対してペルオキシダーゼ、チロシナーゼ、ラッカーゼなどの酵素が活性を示すことがこれまでに報告されているが<sup>1)</sup>、効率的かつ迅速な除去法を確立するには至っていない。本研究では、フェノール系化合物からチロシナーゼとペルオキシダーゼによって生成した中間体生成物の反応性<sup>2)</sup>を利用した効率的な除去法の構築について至適条件の決定とその応用への基礎研究を行ったので報告する。

## 2 実験

### 2.1 チロシナーゼによる除去

マッシュルーム由来のチロシナーゼ(Sigma Aldrich(株)製, EC1.14.18.1, 2590U/mg)を使用し、pH7の緩衝溶液中でチロシナーゼとフェノール化合物を混合することで酵素反応を開始させた。また、フェノール化合物+チロシナーゼ混合溶液にキトサンフィルム(和光純薬化学工業(株)製のキトサン1000より作成)を浸漬させ、酵素反応によって生成したキノン化合物の反応性をUVスペクトル測定から評価した。さらに、混合溶液中でキノン化合物を除去する際にキトサンビーズ(富士紡績(株)製、粒径: 70~200 $\mu\text{m}$ 、比表面積: 70~100 $\text{m}^2/\text{g}$ )を添加させ、フェノール化合物の除去能を評価した。フェノール化合物の濃度は、

4-アミノアンチピリン(4-AA)法と逆相カラム(イナートシルODSII)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、初期濃度との関係から添加率を算出した。

### 2.2 ペルオキシダーゼによる除去

西洋わさび由来のペルオキシダーゼ(Sigma Aldrich(株)製, EC1.11.1.7, 213U/mg)を使用し、ポリエチレングリコール(PEG)と過酸化水素の存在下でペルオキシダーゼとフェノール化合物を混合することで酵素反応を開始させた。酵素反応によって生成したフェノキシラジカルは溶液中で自己重合し、水不溶性なオリゴマーを形成するので、濁度とろ液のUVスペクトル測定から反応の経時変化を調べるとともに、フェノール化合物の濃度を上記と同様に4-AA法とHPLC法から求めた。

## 3 結果及び考察

### 3.1 チロシナーゼによる除去

*p*-クレゾール溶液(0.5mM)にチロシナーゼを加えると、酵素反応によるキノン化合物の生成によって波長 400nm での吸光度が上昇した。また、*p*-クレゾール+チロシナーゼ混合溶液に浸漬させたキトサンフィルム(直径 29mm)では、波長 460nm のピークが浸漬時間とともに上昇し、酵素反応によって生成したキノン化合物がキトサン中のアミノ基と反応して吸着することがわかったので、pH、温度、酵素濃度などの条件を変化させて実験を行った結果、pH7.0、45°C、酵素濃度 50U/cm<sup>3</sup>が至適条件であることがわかった。

pH7.0、45°Cで*p*-クレゾール+チロシナーゼ混合溶液にキトサンビーズを添加するとキノン生成を示す波長 400nm の吸光度が反応時間とともに低下した。チロシナーゼによるキノンへの転化は約 10 分でほぼ完了し、反応時間 60 分での除去率は 92.9%となった。フェノール化合物+チロシナーゼ混合溶液にキトサン溶液を添加した均一系反応では、フェノール化合物とキトサン中のアミノ基のモル比を 1 前後に調節すると凝集沈殿によってフェノール化合物が除去でき、キトサン添加量が

至適濃度に対して過不足すると、凝集が起こりにくいなるため、キノン化合物が溶液中に残存するが<sup>3)</sup>、本研究で行ったキトサンビーズを用いた不均一反応では、キトサンビーズの添加量を増加させることで除去率が上昇でき、吸着後の分別も非常に容易である。

4-tert-ブチルフェノール(4TBP)では、過酸化水素を 0.5mM となるように加えると、チロシナーゼによる酵素反応が起こった。これは、met 型のチロシナーゼが過酸化水素から発生した酸素分子と結合して 4TBP に対して触媒作用をもつ oxy 型に変換するためである<sup>4)</sup>。しかし、チロシナーゼは o-アルキルフェノールに対しては活性を示さないで、種々の p-及び m-アルキルフェノールの除去に本法を応用し、その除去率を評価した。表 1 に示すように、チロシナーゼは炭素鎖長 6 までの直鎖アルキルフェノールに対して活性を示し、本法によって効果的に吸着除去できることがわかった。また、4TBP では過酸化水素存在下で生成する 4-tert-ブチル-o-ベンゾキノンのキトサンとの反応性が低いので、キトサンビーズ添加量を 0.125cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>まで増加させることで除去率は増加したが、その値は 33%に留まった。

### 3. 2 ペルオキシダーゼによる除去

ペルオキシダーゼは、過酸化水素の存在下でフェノール化合物をフェノキシラジカル化させ、o-, m-および p-クロロフェノールに対してオリゴマー化による不溶性ポリマーを生成することでこれらを除去することができた。また、至適条件を検討した結果、クロロフェノール濃度を 2.5mM とした場合、pH6.0, 30°C で、酵素濃度：0.10U/cm<sup>3</sup>, PEG(分子量 1.0×10<sup>4</sup>)濃度：0.10 mg/cm<sup>3</sup>, 過酸化水素濃度：2.5mM と決定できたので、本法を o-, m-および p-クレゾールに対して行った。至適 pH は 7 となり、m-と p-クレゾールは、10~20 分でほぼ完全にフェノキシラジカル化され、不溶性ポリマーを生成した。o-クレゾールでは、酵素濃度を 0.15U/cm<sup>3</sup>まで上昇させると、転化率を 90%以上にすることができたが、オリゴマー化の進行が遅く可溶成分と溶液中に残存するので、キトサンフィルムやキトサンビーズによる吸着を併用したところ、0.25 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>のキトサンビーズを添加することでそのほとんどを除去することができたことは特記すべきことであり、o-アルキルフェノールの除去するための一方法を見いだしたと言える。

### 4 今後の展望と計画

チロシナーゼではキトサンビーズの添加に

**Table 1** Removal of alkyl-substituted phenol compounds by the combined use of tyrosinase and chitosan beads in a pH 7 buffer at 45 °C.

Phenol compound	Tyrosinase (U/cm <sup>3</sup> )	Chitosan beads (cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup> )	Removal (%)
p-cresol	50	0.0050	63.6
	50	0.0125	82.0
	50	0.025	92.9
	50	0.050	92.0
m-cresol	50	0.0050	46.3
	50	0.025	86.2
	100	0.050	94.1
4-ethyl	50	0.025	94.6
3-ethyl	50	0.025	88.0
	75	0.025	90.8
4-n-propyl	50	0.025	93.7
4-n-butyl	50	0.025	97.5
4-tert-butyl	50	0.025	7.8
	50	0.075	21.3
	50	0.125	32.9
(in presence of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5mM) at pH 6)			
4-n-hexyl	50	0.025	60.1
	75	0.025	81.0
(in 20%ethanol+buffer)			
4-n-heptyl	50	0.025	less activity
(in 30%ethanol+buffer)			

よるとキノン化合物の吸着によって、ペルオキシダーゼでは PEG(分子量：1.0×10<sup>4</sup>)と過酸化水素の存在下での不溶性オリゴマーの生成によって、アルキルフェノールを効果的に除去できたので、今後はアルキルフェノールの除去を検討する。また、水溶性カルボジイミドを用いて弱酸性陽イオン交換樹脂やメタクリルまたはアクリル酸をグラフト重合したポリエチレン板に共有結合を介した固定化させることで pH や熱安定性を向上させるとともに反復利用と長期保存を可能にさせる。

### 参考文献

- 1) N. Durán, and E. Esposito, "Potential applications of oxidase enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review", *Appl. Catal. B: Environ.*, **28**, 83 (2000).
- 2) W. -Q. Sun and G. F. Payne, Tyrosinase-containing chitosan gels: a combined catalyst and sorbent for selective phenol removal, *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 79 (1996).
- 3) S. Wada, H. Ichikawa, and K. Tatsumi, Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 304 (1995).
- 4) M. Jiménez and F. García-Carmona, "Hydrogen peroxide-dependent-4-*t*-butylphenol hydroxylation by tyrosinase -a new catalytic activity, *Biochem. Biophys. Acta*, **1297**, 33 (1996).