

# 酵素固定化技術の開発と環境浄化システムへの応用

日大生産工 ○山田和典・柏田 歩・松田清美・平田光男

## 1. 当初の課題の意義, 目的およびその概要

フェノール化合物は環境汚染物質の1つであり, 石油精製, 樹脂製造, 製紙などの工場からの排出が考えられる(1). さらに, 近年ポリカーボネートやエポキシ樹脂の合成原料であるビスフェノール A (BPA)の加熱処理による加工製品材料からの溶出や埋め立てごみ廃棄場から浸出に関する報告もある(2). これらの化合物は環境中で分解されにくいいため, 食物連鎖によって魚類, 両生類, 哺乳類などの水棲動物中で高く濃縮されることも指摘されている(2, 3).

これらのフェノール化合物の分解や除去法として活性炭やゼオライトへの吸着, 膜分離, 電気分解などの化学的処理法や微細藻類やバクテリアを使った生物学的処理法が報告されているが, 副生成物の生成や未反応成分の残存, 設備の大型化や低効率といった問題がある. 我々はこれらの化合物を分解する, または反応性の高い別の化学種に変換できる酵素に着目した(4-6).

本プロジェクトでは, ①マッシュルームと麹菌由来のチロシナーゼによる *p*-アルキルフェノール(7-9)及び BPA とその誘導体(10)のキノン酸化と生成したキノン化合物のキトサンビーズへの吸着を利用した除去(8), ②過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)存在下で, 西洋ワサビペルオキシダーゼによる BPA のラジカル化とカップリング反応による不溶性オリゴマーの形成を利用した沈殿除去とビスフェノール誘導体の除去(11,12), ③イオン交換樹脂に固定化したマッシュルームチロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去(13,14)に関する研究を行ったので, その成果を総括する.

## 2. 研究成果

### 2. 1 麹菌チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去

月桂冠(株)から提供された麹菌によって産生されチロシナーゼを用い(15), その比活性は 936 と 1170 U/mg-solid であった.

pH6.0 で *p*-アルキルフェノール溶液に麹菌チ

ロシナーゼ溶液とキトサンビーズ(富士紡績(株), 粒径: 70~200 $\mu$ m)を加えて反応を開始させた. まず, *p*-クレゾールを対象物質として麹菌チロシナーゼの至適条件を pH6.0, 30°C と決定した. 至適温度はマッシュルームチロシナーゼの 45°C に比べて低かった. このような至適条件の違いは, 由来の異なる同種の酵素を用いる際にしばしば見られ, 酵素のアミノ酸配列, 解離基密度などが異なるためと考えられる.

*p*-*n*-アルキルフェノール溶液に麹菌チロシナーゼ(150U/cm<sup>3</sup>)を加えると, キノン化合物の形成と同時にキトサンビーズ中のアミノ基にキノン化合物が結合して高く除去された(4, 5). キトサンビーズ量 0.025cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>では反応時間 100 分で *p*-クレゾールを完全に除去することができ, いずれの *p*-*n*-アルキルフェノールに対しても 97%以上の除去率が得られ, 高く除去できた.

さらに, 分岐状 *p*-アルキルフェノールの除去を検討した結果, キノン酸化とキノン吸着が *p*-*n*-アルキルフェノールに比べて遅かったので, 麹菌チロシナーゼ濃度とキトサンビーズ添加量を増加させることで, 90~100%の除去率を得ることができた. 4-*tert*-ブチルフェノール(4TBP)と 4-*tert*-ペンチルフェノール(4TPenP)はマッシュルームチロシナーゼを使ってキノン酸化するには H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が必要であったが(11), 麹菌チロシナーゼでは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えることなくこれらのアルキルフェノールを効率的に除去できたことは本方法における研究成果である.

### 2. 2 マッシュルームチロシナーゼによるビスフェノールAの除去

Sigma 社製のマッシュルームチロシナーゼ(EC 1.14.18.1, 比活性: 2590U/mg)を用いて BPA をキノン酸化する際の至適条件とキトサンビーズへのキノン吸着による除去を検討した.

BPA のキノン酸化は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えると効率よく進行し, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度 0.3~0.4mM で最大となった. チロシナーゼには3つの形体があり, その

---

## Development of Enzyme Immobilization and its application to Environmental Purification Systems

Kazunori YAMADA, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA and Mitsuo HIRATA

多くは mettyrosinase (Emet 体)として存在する.

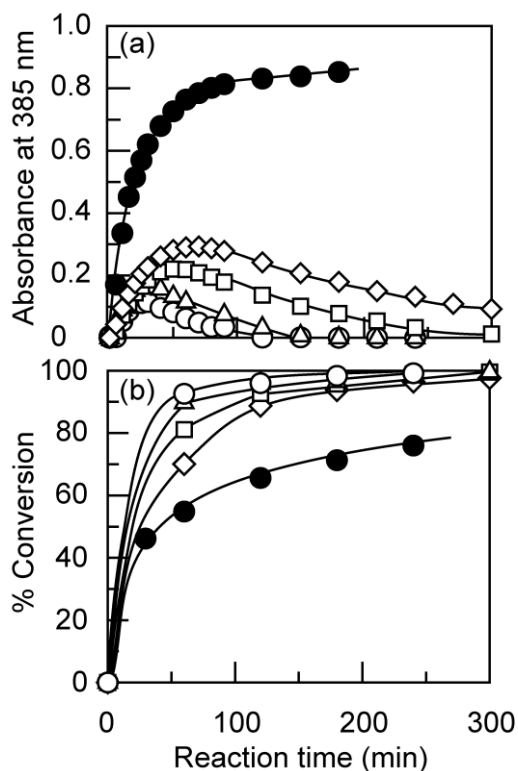


Figure 1 Removal of BPA (0.3 mM) by combined use of mushroom tyrosinase (200 U/cm<sup>3</sup>) and chitosan beads (●: without, ◇: 0.025, □: 0.050, △: 0.100, ○: 0.150 (cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>)) in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 mM) at pH 6.0 and 40°C.

しかし, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の存在下では Emet 体が oxytyrosinase 体に転化し, キノン酸化を加速すると考えられている. さらに, pH と温度依存性を検討した結果, pH6.0~7.0, 40°C を至適条件と決定できた. キトサンビーズ量を変化させた際の吸光度の変化(酵素濃度: 200U/cm<sup>3</sup>)を見ると(図 1), キトサンビーズの添加によって吸光度の上昇が抑えられ, キトサンビーズ量 0.050 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> では 300 分で形成したキノン化合物をほぼ除去できた. さらにキトサンビーズ量を増加させるとより短時間で除去できるようになった(10).

### 2. 3 ペルオキシダーゼによるBPAおよびその誘導体の除去

Sigma (株)から購入した西洋ワサビペルオキシダーゼ (E.C 1.11.1.7, 224U/mg-solid)を使用し, 0.3mM の BPA 溶液を対象として BPA を除去する際の至適条件の決定と種々のビスフェノール誘導体の除去を検討した.

pH6.0 の BPA 溶液(0.4mM)に西洋ワサビペル

オキシダーゼ, 分子量  $1.0 \times 10^4$  のポリエチレングリコール(10K-PEG), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えることによって酵素反応を開始させた. 西洋ワサビペルオキシダーゼはチロシナーゼが活性を示さない *o*-アルキルフェノールに対して活性を示すことが本研究で明らかとなっており(8), BPA を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下でラジカル化し, 水不溶性オリゴマーが形成することがわかった. 残留率は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度の上昇とともに低下し, [BPA]/[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=1.0 (BPA 濃度: 0.3mM)において BPA が完全に処理された. ペルオキシダーゼの触媒作用は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下で進行し, 低濃度では BPA の他に形成した 2 または 4 量体をラジカル化する際にも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が消費されるため不足し, 逆に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が過剰に存在すると, ペルオキシダーゼの一部が不活性な形体となるため, 活性が低下するとされている(16). また, PEG を加えると, 酵素反応によって形成したラジカルによる酵素の失活や不溶性オリゴマーへの包括が抑えられるため, 酵素の活性が保持され, BPA の処理時間を短縮することができた(17). また, 0.3mM の BPA に対して pH6.0, 30°C, [BPA]/[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=1.0, [HRP]=0.1U/cm<sup>3</sup>, [10K-PEG]=0.1mg/cm<sup>3</sup> を至適条件と決定できた.

さらにビスフェノール誘導体を対象に除去実験を行った結果(表 1), 10U/cm<sup>3</sup>まで濃度を上昇させても転化率が約 30~50%程度に留まったビスフェノール S と 2,4'-ジヒドロキシジフェニルスルホンを除いて他のビスフェノール誘導体は酵素濃度を上昇させる必要があるものもあったが, ほぼ完全に処理することができた. また, 酵素反応後の溶液の pH を塩酸で 4.0 まで低下させることで形成した不溶性オリゴマーが凝集しやすくなり, ろ過によって透明な溶液を得ることができた.

### 2. 4 固定化チロシナーゼの反復利用と *p*-アルキルフェノールの除去への応用

酵素の触媒機能を反復して利用するため, ここではマッシュルームチロシナーゼの固定化担体としてアクリル酸系弱酸性イオン交換樹脂 DAIAION, WK10 (三菱化学(株), 粒径: 300~1180μm, イオン交換容量: 2.5 mmol/cm<sup>3</sup>)を選び, 共有結合を介した固定化を行った.

濃度 2000U/cm<sup>3</sup> のチロシナーゼ溶液にイオン交換樹脂 0.5cm<sup>3</sup> を加えた後, 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を溶解させた pH7.0 の緩衝溶液を滴下し, 4°C で所定時間攪拌することで, 固定化反応を行った. 内径 5.0mm, 長さ 12cm のカラム 2 本にチロシ

ナーゼ固定化イオン交換樹脂 0.5cm<sup>3</sup> と市販のキトサンビーズを所定量充填した。

45°C で 0.5mM の *p*-クレゾール溶液 20cm<sup>3</sup>

Table 1 Removal of BPA and its derivatives by horseradish peroxidase in the presence of 10K-PEG (0.10 mg/cm<sup>3</sup>) at pH 6.0 and 30 °C.

Bisphenol derivatives	[HRP] (U/cm <sup>3</sup> )	Reaction time (min)	Residual %	Color of precipitates
bisphenol A	0.1	120	0	white
bisphenol B	0.03	90	0	yellowish white
bisphenol C (0.05mM)	0.01	60	0	orange
bisphenol E	0.1	120	0.5	ocher
bisphenol F	0.5	120	2.6	gray
bisphenol S	10	120	48.7	brown
bisphenol T	0.1	120	0.2	yellowish white
bisphenol Z (0.01mM)	0.05	60	0	white
diphenolic acid	0.5	60	0.3	white
4,4'-dihydroxydiphenyl ether	0.001	60	0	pink
2,4'-dihydroxydiphenylmethane	0.1	120	0.5	ocher
2,4'-dihydroxydiphenylsulfone	10	120	28.7	brown
4,4'-dihydroxybenzophenone	0.5	90	0.3	white
2,4'-dihydroxybenzophenone	1.5	120	0.2	yellowish white

(pH7.0)をチロシナーゼ固定化樹脂を充填したカラムに流入し、その溶出液をキトサンビーズを充填したカラムに流入させた。溶出液は2本のカラムを通して繰り返し循環させた。

異なる固定化時間で調製したチロシナーゼ固定化樹脂 0.5cm<sup>3</sup> と市販のキトサンビーズ 4.0 cm<sup>3</sup> を充填したカラムに *p*-クレゾール溶液を3回循環させると(1回の除去実験)、固定化時間72時間で調製したチロシナーゼ固定化樹脂では *p*-クレゾールをほぼ除去できた。この際、*p*-クレゾール溶液は2本のカラムを約30分で通過し、1回の除去実験に90分の時間を要した。また、5回の除去実験を繰り返した際の除去率は95%以上となり、共有結合を介した固定化によりチロシナーゼの酵素活性を反復利用できることがわかった(13)。しかし、短い固定化時間で調製したチロシナーゼ固定化樹脂では固定化チロシナーゼの熱変性や生成したキノン化合物によるアロステリック効果によって活性が徐々に低下した(14)。

キトサンビーズが生成したキノン化合物を吸着し、固定化チロシナーゼの活性の低下を抑えるには、4.0cm<sup>3</sup>のキトサンビーズが必要であったが、溶液がカラムを通過する時間が長いと、固定化チロシナーゼの活性を低下させるので、粒径の大きい架橋キトサンビーズを作成した。キトサン 500(和光純薬(株))を2.0wt%に溶解した酢酸水溶液(濃度:1wt%)10cm<sup>3</sup>を1wt%のトリポリリン酸ナトリウム(TPP)溶液中に滴下する

ことで得たキトサンビーズをエピクロロヒドリン15mmolを含む1MのNaOH水溶液に移し、75°Cで24時間加熱することで架橋キトサンビ

ーズ(粒径:2.0~2.8mm)を調製した。架橋キトサンビーズを内径8.0mmのカラムに充填し、上記と同様の手順で除去実験を行った。5.0cm<sup>3</sup>の架橋キトサンビーズを充填すると95%以上の除去率が得られ、処理時間を約70分に短縮できた。さらに、除去率の温度とpH依存性を検討した結果、固定化していないチロシナーゼの至適pHである7.0では50°Cまでの温度範囲で反復利用が可能であることがわかった。また、pH依存性を評価した結果、図1に示すように固定化していないチロシナーゼの至適pHより高いpH8.0や9.0で繰り返し利用できるように

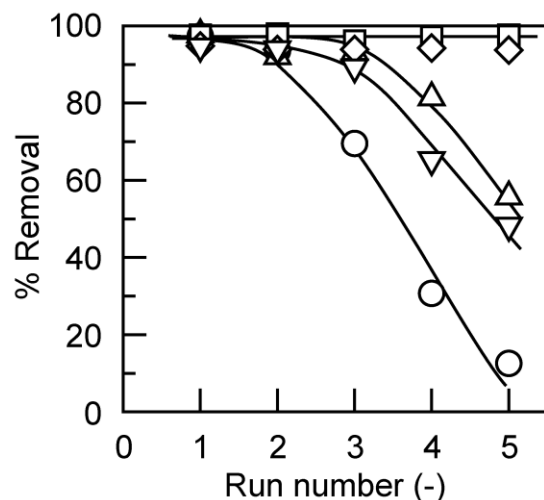


Figure 2 Reusability of mushroom tyrosinase immobilized on an anion-exchange resin, DAIAION WK 10, for removal of *p*-cresol at pH 5.0 (○), 6.0 (△), 7.0 (□), 10.0 (◇), and 11.0 (▽) at 45°C. Average immobilized amount =2.81 mg/cm<sup>3</sup>. Amount of packed chemically crosslinked chitosan beads=5.0 cm<sup>3</sup>.

なり、固定化によって酵素の pH と熱安定性が向上したことがわかった。

### 3. 問題点および今後の展望

酵素の触媒機能を利用した環境汚染物質の除去と水質浄化を目的とした一連の研究を行ってきた中で、マッシュルームと麹菌由来のチロシナーゼや西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼの基質選択性と至適条件を評価した。これらの酵素を使ってアルキルフェノール、ビスフェノール A 及びその誘導体などを除去することができたので、固定化と酵素の反復利用に関する点では、マッシュルームチロシナーゼのイオン交換樹脂への固定化を行った。そして、至適固定化条件の決定と固定化酵素の反復利用性を評価できた。今後は種々の直鎖状および分岐状アルキルフェノールの除去へ展開させ、固定化チロシナーゼの安定性と再利用性をさらに向上させるとともに他の酵素の固定化に関する研究を展開する予定である。この点では、イオン交換樹脂よりも親水化処理した PE 板またはフィルムへの固定化の方が経済的かつ合理的な処理技術であるといえ、今後の研究方向の1つといえるだろう。つまり、実用化を考える上で、酵素の反復利用は重要な課題であり、これらの酵素の高分子担体への共有結合を介した固定化と固定化条件を検討することで、高く活性を保持した安定な固定化酵素の構築を目指すことができる。

### 4 社会および学協会等への貢献度

4種類の異なる酸化還元酵素(由来の異なるチロシナーゼ2種類とペルオキシダーゼ2種類)を用いてアルキルフェノール、BPA及びその誘導体を対象として水溶液中からこれらの化合物を高く除去するための至適条件を決定し、水質汚染物質の環境中への排出防止や水質浄化を目的とした現在の環境問題を解決すべき簡易的な除去方法を確立できた。さらに、固定化による酵素の反復利用に関する基礎的知見を得ることができ、その研究成果は日本化学会、高分子学会、日本農芸化学会、日本キチン・キトサン学会などの国内学会やアメリカ化学会で発表するとともに、その研究成果を *Biotechnology. Progress, Journal of Applied Polymer Science, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 高分子論文集などの国内外の学術雑誌に掲載した。また、西洋ワサビペルオキシダーゼによるビスフェノール A 及びその誘導体の除去に関する一連の研究成果は社会的関

心となっている環境汚染物質を含む汚水の処理の生化学的処理の一方法を見だし、1件の特許を出願するに至った。

### 5 参考文献

- 1) Guillet, L. J., Gunderson, M. P., *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, p113-136 (2000).
- 3) Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A. G. M., Bowmer, T., *Aqua. Toxicol.*, **43**, 77-92 (1998).
- 4) Sun, W. Q., Payne, G. F., *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 79-86 (1996).
- 5) Ikehata, K., Buchanan, I. D., Smith, D. W., *J. Environ. Eng. Sci.*, **2**, 463-472 (2003).
- 6) Ghiourelis, M., Nicell, J. A., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **75**, 98-106 (2000).
- 7) Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, T., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823-829 (2005).
- 8) Yamada, K., Inoue, T., Akiba, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2467-2475 (2006).
- 9) Yamada, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., Nakamura, Y., Hata, Y., Higashida, K., in *Polym. Prep., in 232th ACS Meeting*, **47**(2), 140-141 (2006).
- 10) 杉山立樹, 武蔵絵里子, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 山田和典, 高分子論文集, in press.
- 11) Yamada, K., Ikeda, N., Takano, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Prep. of Expand. Abst. of Environ. Chem., in 234th ACS Meeting*, **48**(2), 94-98 (2006).
- 12) Yamada, K., Shibuya, T., Noda, M., Uchiyama, N., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2503-2510 (2007).
- 13) 山田和典, 市村葉子, 西健次郎, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 第 21 回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集, p114-115 (2007).
- 14) 佐藤えりか, 田村鮎美, 川越潤一, 市村葉子, 西健次郎, 山田和典, 高分子論文集, in press.
- 15) Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., Ichishima, E., *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 400-405 (2004).
- 16) Jiménez, M., and Carcía-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33-39 (1996).
- 17) Duarte-Vázquez, M. A., Ortega-Tovar, M. A., García-Almendarez, B. E., Regalado, C., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 42-47 (2002).