

酸化還元酵素による 1-ナフトールのキノン酸化における 至適条件の決定とキトサンを利用した除去

日大生産工(院) ○篠崎 文義

日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

環境汚染物質であるフェノール化合物は多くの工場施設から排出されており、その中に水生生物に対して非常に強い毒性を有し、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がある。ナフトール類を除去するために物理的または化学的処理法が検討されているが、ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)やペルオキシダーゼなどの酸化還元酵素を利用した処理法は、従来の処理法と比較して簡易かつ環境負荷の少ない。これまでペルオキシダーゼによるフェノール化合物の処理に関する研究は幅広く行われているが¹⁾、PPOを用いた例は非常に少ない。

本研究では、クレゾラーゼ活性とカテコラーゼ活性の2段階の酵素活性を持つ酸化還元酵素であるPPOによる1-ナフトールのキノン酸化におけるpH、温度、酵素濃度依存性を評価し、至適条件を決定した後、生成したキノンをキトサンへのキノン吸着による除去を行うためのキトサンビーズの添加の効果を検討した。さらに本方法を1-ナフトールの構造異性体である2-ナフトールの除去へ応用した^{2,3)}。

【実験】

<試料および溶液調整>

Worthington Biochemical製のマッシュルーム由来のPPOを使用し、比活性は965U/cm³であった。異なるpHのリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて0.40mMの1-ナフトール溶液と400U/cm³のPPO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)は富士紡績(株)から購入し、所定のpHの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PPO溶液を加えることによって酵素反応を開始させ([1-ナフトール]=0.30mM, [PPO]=100U/cm³)、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530nm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た。さらに反応溶液に所定量のキトサンビーズを加え、キノン吸着による除去実験を行った。

<HPLC法による転化率の測定>

反応溶液から採取した溶液を80℃の恒温槽中に数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45vol%のアセトニトリル水溶液を流速1.0cm³/minで送液し、保持時間7.6分でのピーク面積から転化率を求めた。また、2-ナフトールの転化率は1-ナフトールと同様の条件で求めた。

【結果および考察】

1-ナフトール溶液にPPO溶液を添加すると、酵素反応により溶液は紫色に変色し、吸光度は時間とともに上昇した。反応を続けると沈殿物の形成が確認できた。沈殿物の形成は、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。

1-ナフトールをキノン酸化させる際の至適pHと至適温度を酵素濃度100U/cm³で検討した。pHに対する反応時間5時間での転化率と吸光度および時間に対する転化率のグラフでの反応初期の傾きから求めた初速度を図1に示す。吸光度と同様に転化率、初速度でも最

Determination of Optimum Conditions for Quinone Oxidation of 1-naphthol
by an Oxidoreductase and Its Removal with Chitosan

Fumiyoshi SHINOZAKI, Ayumi KASHIWADA,
Kiyomi MATSUDA, Kazunori YAMADA,

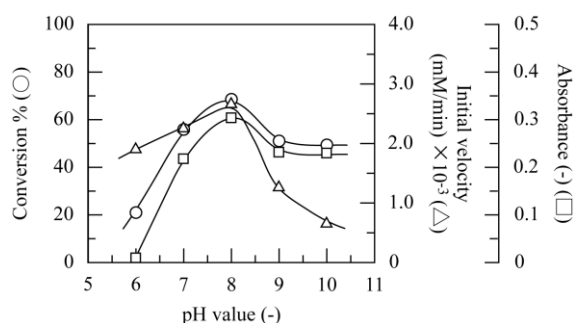


Figure 1 The effect of pH value on PPO-catalyzed (100 U/cm³) quinone oxidation of 1-naphthol (0.30 mM) at 40°C

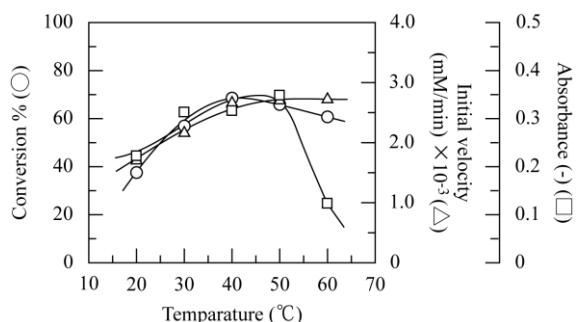


Figure 2 The effect of temperature on PPO catalyzed (100 U/cm³) quinone oxidation of 1-naphthol (0.30 mM) at pH 8.0.

大値を示したため、至適 pH を 8.0 と決定した。

次に、至適 pH と決定した 8.0 における至適温度を検討した。温度に対する反応時間 5 時間での転化率、吸光度および初速度を図 2 に示す。転化率は 40°C、吸光度は 50°C、初速度は 60°C でそれぞれ最大となった。温度が高くなるにつれて初速度が上昇したが、温度が高くなると酵素の失活が早くなり、長時間反応させることで転化率が減少した。また、吸光度はオリゴマー沈殿物などによる上昇も考えられるため、至適温度を 40°C と決定した。

至適条件と決定した pH8.0、40°C において、反応溶液中に 0.20cm³/cm³ のキトサンビーズを添加することによってキノン化した 1-ナフトールの除去実験を行った。反応時間に対する吸光度と転化率の変化を図 4 に示す。キトサンビーズを添加すると、キトサンビーズを添加していないときと比較して、吸光度の上昇が抑えられ、酵素反応によって形成されたキノンがキトサンビーズに化学吸着したことがわかった。また、転化率の上昇はキトサンビーズを添加していないときよりも大きくなった。これは反応を阻害するキノンがキトサンビーズに吸着し、溶液中から除去されることによって酵素反応が促進したためと考えられる。このとき、1-ナフトールを 24 時間で完

全に除去することができ、酵素濃度を 150U/cm³まで上昇させると、除去時間を 10 時間に短縮できた。

1-ナフトールにおいて決定した至適条件を 2-ナフトールに応用したところ、反応時間 24 時間では転化率は 23%と低く、酵素濃度を 300U/cm³まで上げ反応時間を 54 時間まで延ばすと、転化率は 60%に達した。このことから、ヒドロキシ基の置換位置が異なることで酵素反応による転化率が変化することがわかった。今後は 2-ナフトールの完全な除去を目指す。

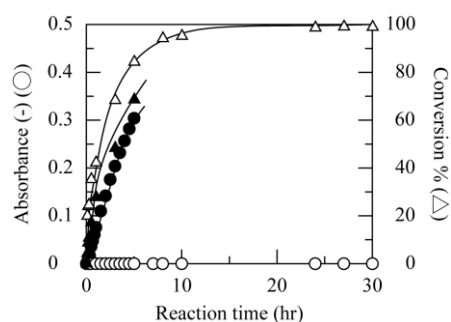


Figure 3 Removal of 1-naphthol through PPO-catalyzed quinone oxidation and quinone-adsorption on chitosan beads in the absence (●, ▲) and presence of chitosan beads of 0.20 (○, △) cm³/cm³ at pH 8.0 and 40°C.

【結論】

マッシュルーム由来の PPO を用いて 1-ナフトールをキノン酸化させる際の至適 pH と温度はそれぞれ 8.0 と 40°C となり、キトサンビーズを併用することで完全に除去することができた。また、この条件を応用した結果、2-ナフトールにも反応を示すことがわかった。今後は 2-ナフトールの至適条件を検討し、完全な除去を目指す。

【参考文献】

- [1] K. Yamada, T. Shibuya, M. Noda, N. Uchiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2503 (2007).
- [2] M. Jimenez, F. G. Carmona, *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33 (1996).
- [3] M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **118**, 721 (2010).