

西洋わさび由来ペルオキシダーゼによる 分岐状アルキルフェノール類の処理

日大生産工(院) ○川端慧浩

日大生産工 木村悠二 柏田 歩 山田和典

【諸論】合成樹脂、酸化防止剤や非イオン性界面活性剤の製造原料であるアルキルフェノールは内分泌かく乱作用があることが懸念されており、分岐状アルキルフェノールは直鎖アルキルフェノールに比べて発がん性や遺伝子異常、免疫系への影響大きいことが危惧されている。アルキルフェノールはこれまでに活性汚泥法や活性炭吸着、オゾン酸化法などの化学的処理法による分解や除去に関する研究が報告されているが、処理速度が遅い、高濃度の汚染物質の除去に適さないなどの課題があるため、短時間で効率的に処理する方法として酸化還元酵素の利用に着目した。酸化還元酵素には、チロシナーゼ、ラッカーゼ、ペルオキシダーゼなどがあり、ペルオキシダーゼは西洋わさび、大豆、大根などに存在し、動植物内に広く分布している酵素である。ペルオキシダーゼは過酸化水素(H_2O_2)存在下で水素供与体をラジカル化する触媒機能を有し、酵素反応により生成したフェノキシラジカルはラジカル形成とラジカルカップリング反応を繰り返すことで高分子量化し水不溶性オリゴマーを形成する。本研究では西洋わさび由来のペルオキシダーゼ(HRP)による分岐状アルキルフェノール類の処理を検討した。また、ポリエチレングリコール(PEG)を添加すると酵素の活性を維持できる¹⁾ので、PEGの添加による効果も検討した。

【実験】

〈試料および溶液調製〉

Worthington Biochemical 社から西洋わさび由来のペルオキシダーゼを購入し、その比活性は162.9U/mgであった。pH6.0のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて0.40mMの分岐状アルキルフェノール、4.0mg/cm³の分子量10000のPEG、6.0mMの H_2O_2 、5.0U/cm³のHRPを調製した。実験に用いた4-イソプロピルフェノール(4IPP)、4-sec-ブチルフェノール(4SBP)、4-tert-ブチルフェノール(4TBP)、4-tert-ペンチルフェノール

(4TPP)は東京化成工業(株)および関東化学からを購入した。

〈酵素による酸化カップリング反応〉

pH6.0、30℃で各アルキルフェノール溶液に H_2O_2 溶液およびHRP溶液を加えることによって酵素反応を開始させ、所定時間ごとに600nmにおける吸光度を測定し、濁度を計算した。

〈HPLC法による残留率の算出〉

所定時間ごとに反応溶液から採取した溶液1.0cm³を、80℃の恒温槽中に2分間浸して酵素を失活させた後、溶液20mm³をHPLCに注入し、アルキルフェノールごとにアセトニトリル水溶液の組成を調整し、保持時間が6~8分となるよう設定し、初期濃度でのピーク面積比から残留率を求めた。

【結果および考察】

ビスフェノールAの酸化の至適条件²⁾であるpH6.0、30℃、 H_2O_2 溶液0.30mMでHRPに4IPP、4SBP、4TBP、4TPPのそれぞれの酸化を行ったところ、水不溶性オリゴマーが生成し溶液が白濁した。さらに、0.10mg/cm³のPEGを含む各アルキルフェノール溶液にHRPを加えると、溶液の濁度が急激に上昇したので、PEG不在下と存在下において酵素濃度依存性を評価した。

PEG不在下において酵素濃度に対する反応時間5時間での4IPPの酸化における基質残留率を図1示す。酵素濃度が上昇すると残留率が低下し、4IPPは1.0U/cm³で完全に処理された。また、PEG存在下において酵素濃度に対する4IPPの処理に要した時間の変化を図2に示す。酵素濃度が上昇すると処理時間が短縮し、0.02U/cm³のとき4時間で完全に処理された。このことからPEGを添加することでPEG不在下のときに比べて使用する酵素濃度を大幅に下げることができ、PEGによる酵素の活性保持が効果的であることがわかった。同様に4SBP、4TBPおよび4TPPについてもPEG不在下および存在下での処理を行った結果を表1に示す。

The removal of the branched alkyl phenol by peroxidase from horseradish

Masahiro KAWABATA Yuji KIMURA Ayumi KASHIWADA and Kazunori YAMADA

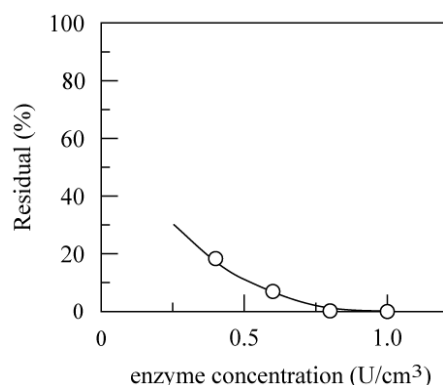


Fig.1 The effect of enzyme concentration on HRP-catalyzed treatment of 4IPP without PEG.

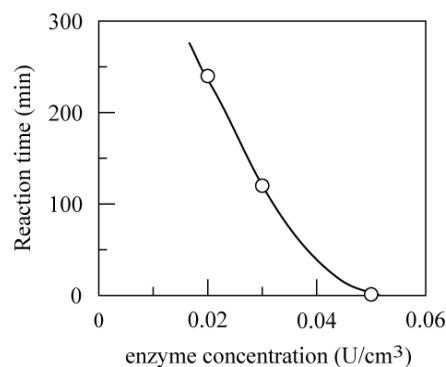


Fig.2 The effect of enzyme concentration on HRP-catalyzed treatment of 4IPP with PEG.

Table 1 The effects of enzyme concentration on HRP-catalyzed treatment of branched alkyl phenols in the presence of 10k-PEG.

branched alkyl phenols	[HRP] (U/cm ³)	[10k-PEG] (mg/cm ³)	removal time (min)	residual (%)
4IPP	1.0	-	20	0
	0.02	0.10	240	0
4SBP	1.0	-	20	0
	0.03	0.10	50	0
4TBP	2.0	-	300	0.3
	0.05	0.10	120	0
4TPP	1.8	-	30	0
	0.05	0.10	90	0

HRPによる酵素反応は非常に速く進行し、各アルキルフェノールを短時間で処理でき、4SBPはHRP濃度1.0U/cm³において20分で処理することができ、PEGを添加することで使用する酵素濃度を0.03U/cm³まで下げることができた。4TBPはHRP濃度2.0U/cm³に上昇させても完全に除去することができなかったが、PEGを添加することによりHRP濃度0.05U/cm³のとき、120分で完全に処理することができた。4TPPはHRP濃度1.8U/cm³において30分で処理することができ、PEGを添加することで酵素濃度を1/36とすることができた。また、反応後生成した水不溶性オリゴマーは、45μmのメンブレンフィルター、5Cのろ紙、遠心分離のそれぞれによる除去を検討した結果、PEGの不在下で酵素反応させた溶液のオリゴマーはいずれの除去法でも除去することができたが、PEGの存在下で酵素反応させた溶液で生成したオリゴマーの粒径が小さいため、フィルターによるろ過以外では溶液の濁度にほとんど変化がなかった。そこで、溶液のpHを下げることで水不溶性オリゴマーが凝集することを利用し、酵素反

応が終了した後に塩酸を用いてpHを3に下げ一晩攪拌した後、ろ紙によるろ過で溶液中から除去することができた。以上のことからPEGを添加することにより酵素の活性を保持することができ、より少量の酵素で各分岐状アルキルフェノールを処理することができた。

【結論】

分岐状アルキルフェノールはHRPによる酵素反応で処理することができることがわかった。また、PEGを添加することにより酵素の活性を長時間保持することができ、使用するHRPの量を大幅に減少することができ、ろ紙を用いることによって生成したオリゴマーを除去することができた。

【参考文献】

- 1) S. R. Savic, S. M. Stojmenovic, M. Z. Petronijevic, Z. B. Petronijevic, *App. Biol. Microb.*, **50**, 214-218 (2014)
- 2) K. Yamada, N. Ikeda, Y. Takano, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Environ. Technol.*, **31**, 243-256 (2010)