

## 酸化還元酵素とキトサンを用いた直鎖状と分岐状アルキルフェノール類の除去

日大生産工(院) ○対馬 美月  
日大生産工 木村悠二 柏田 歩 山田和典

## 【緒論】

界面活性剤の原料であるアルキルフェノールエトキシレートは環境中でアルキルフェノールに転換される。アルキルフェノール類の中には内分泌かく乱作用を示すものもあり、魚類をはじめとする環境全体に被害が報告されている。そのためオゾン酸化法、電気分解法など様々な除去法が開発されているが、本研究では従来の除去法より環境負荷が少ない酵素を用いた除去法に着目した<sup>1,2)</sup>。酸化還元酵素であるポリフェノールオキシダーゼ(PPO)によってアルキルフェノール類をキノンへ転化させ、形成したキノンをキトサンに吸着させることで水溶液中からの除去を行った。酵素反応によって生成するキノン化合物の中で比較的安定な4-*tert*-ペンチルフェノール(4TPP)を対象に除去を検討し、さらに、他の分岐状および直鎖状アルキルフェノール対象にアルキル鎖や構造による除去効率を比較検討した。また、粉末状のキトサンやキトサン溶液を用いて除去を行い、キトサンビーズとの除去効果を比較した。

## 【実験】

## ＜試料および溶液調製＞

Sigma-Aldrich(株)からマッシュルーム由来のPPO(比活性:845U/mg)を購入した。対象とするアルキルフェノール類は和光純薬工業(株)および東京化成工業(株)から購入した。pH7.0のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて4TPPとPPO溶液を調製した。また、富士紡績(株)から購入したキトサンビーズ(粒径:70~200 $\mu$ m, 比表面積:70~100m<sup>2</sup>/g)を緩衝溶液中で保存した。さらに、大日本精化工業(株)から提供されたキトサン粉末と和光純薬工業(株)製のキトサン300からキトサン溶液を調製した。

## ＜酵素反応によるキノン酸化＞

pH7.0, 40°Cで4TPP溶液にPPO溶液を加えて酵素反応を開始させた。所定時間ごとにキノンの最

大吸収波長である400nmで吸光度を測定し、酵素濃度依存性を検討した。また、全有機体炭素分析(TOC-5000A)(島津製作所製)よりキノン吸着による4TPPの除去を検討した。

## ＜HPLC法による転化率の決定＞

所定時間ごとにHPLCにより転化率を求めた。GLサイエンス(株)製の逆相カラムInertsil ODS-3を用いて60%アセトニトリル水溶液を流速1.0 cm<sup>3</sup>/minで送液し、保持時間7.6分でのピーク面積を測定した。

## ＜キトサンフィルムによるキノン吸着＞

キトサンフィルムを作成し、フィルム存在下で4TPPを用いて酵素反応を行った。市販のセルローズフィルムも同様に酵素反応を行い、キノン吸着の反応性を比較した。

## ＜他のアルキルフェノール類の除去＞

アルキル鎖長1~9の直鎖状と分岐状アルキルフェノール溶液を調製し、4TPPと同様に酵素反応させた。酵素濃度依存性を評価し、アルキル鎖や構造による除去効率を比較した。

## ＜キトサン粉末または溶液を用いた除去＞

pH7.0, 40°Cでキトサンビーズ0.10cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>に相当するキトサン粉末0.0075g/cm<sup>3</sup>を添加して酵素反応を開始した。また、pH6.0の4TPPとPPO混合溶液に、アミノ基濃度が0.05~3.0mMとなるようにキトサン溶液を加えて24時間攪拌し、形成した不溶性の凝集体をろ過した後、吸光度を測定した。

## 【結果および考察】

4TPP溶液にPPOを加えると、吸光度と転化率は反応時間とともに上昇し、4TPPがPPOによってキノン酸化されることがわかった。酵素濃度30U/cm<sup>3</sup>で4TPPを処理した際の吸光度と転化率の変化を図1に示す。キトサンビーズ不在下では、転化率は反応時間360分で94.6%にとどまったが、キトサンビーズ存在下では、吸

## Removal of Linear and Branched Alkylphenols by Combined Use of an Oxidoreductase and Chitosan

Mitsuki TSUSHIMA, Yuji KIMURA, Ayumi KASHIWADA and Kazunori YAMADA

光度はゼロとなり、転化率は 180 分で 100%に達した。さらに、ビーズ量の増加や酵素濃度の上昇させることで除去時間を短縮することができた。次に、キトサンとセルロースフィルムでのキノン吸着を比較した。4TPP および酵素存在下で攪拌させたキトサンフィルムではキノンのピークが上昇したが、セルロースフィルムでは変化がなかった。また、キノンとキトサンの凝集体を IR で測定すると 1590cm<sup>-1</sup> 付近に N-H 変角振動のピークが確認された。このことから、生成したキノンはキトサンのアミノ基と反応することがわかった。

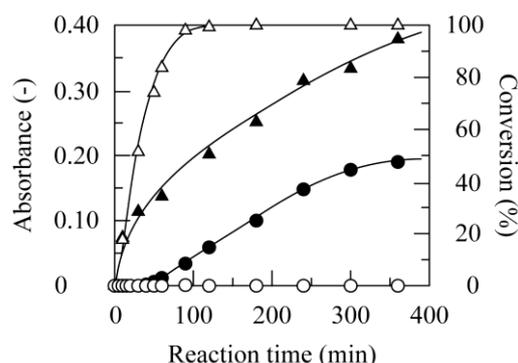
さらに、他のアルキルフェノールでの除去を試みた。他のアルキルフェノールの処理を表 1 に示す。表 1 より、他のアルキルフェノールも PPO 濃度は異なるがそれぞれ 97%以上の転化率が得られた。キトサンビーズを加えると、アルキル鎖が 5 以上のアルキルフェノール類は吸光度がゼロになり水溶液中から完全に除去することができた。しかし、アルキル鎖が 1-4 のアルキルフェノールは吸光度がわずかに残った。これは形成したキノンの一部がロイコキノンに変換したためと考えられる<sup>3)</sup>。アルキル鎖の構造の違いをブチルフェノールで比較すると、*tert*->*sec*->*n*-の順で酵素濃度が上昇し、同じ炭素数では構造が嵩高くなるほど高い酵素濃度が必要であることがわかった。また、直鎖状アルキルフェノールは、アルキル鎖が長くなるほど必要な PPO 濃度は低下したが、分岐状アルキルフェノールではアルキル鎖が長くなるほど酵素濃度は上昇した。

粒径 74~100μm(比表面積 0.06m<sup>2</sup>/g)のキトサン粉末を用いて 4TPP を処理すると吸光度は反応

**Table 1** Enzymatic removal of linear and branched alkylphenols by combined use of PPO and chitosan beads.

Alkylphenol	Initi. conc. (mM)	[PPO] (U/cm <sup>3</sup> )	Removal time (min)	without chitosan beads		with chitosan beads at 0.10 cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup>		
				Abs (-)	Conversion (%)	Abs (-)	Conversion (%)	
p-cresol	-CH <sub>3</sub>	0.30	8	360	0.21	96.5	0.02	100
4EP	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.30	8	360	0.15	100	0.03	99.3
4NProP	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.30	4	360	0.15	98.0	0.02	98.0
4IPP	-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>	0.30	10	90	0.28	87.5	0.03	100
4NBP	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	0.30	4	360	0.19	100	0.02	99.4
4SBP	-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>	0.30	10	360	0.25	99.3	0.02	99.3
4TBP	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.30	30	120	0.11	99.7	0.03	100
4NPenP	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	0.30	4	360	0.25	100	0	99.3
4TPP	-CH <sub>2</sub> -C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.30	30	180	0.20	62.8	0	100
4NHexP	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	0.20	3	60	0.20	99.1	0	100
4NHepP	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	0.10	2	360	0.07	98.4	0	97.5
(DMSO : 11.25v/v%)								
4NOP	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	0.10	2	360	0.09	97.3	0	97.0
(DMSO : 26.6v/v%)								
4TOP	※	0.10	40	180	0.09	94.4	0	100
(DMSO : 7.5v/v%)								
4NNP	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH <sub>3</sub>	0.10	3	360	0.09	93.3	0	97.3
(DMSO : 31.5v/v%)								

※ -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>



**Figure 1** The time course of absorbance at 400 nm (circle) and conversion % value (triangle) for 4TPP (0.30 mM) solution containing PPO (30 U/cm<sup>3</sup>) in the with (open) and without (shaded) of chitosan beads of 0.10 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> at pH 7.0 and 40°C.

時間 3 時間でゼロとなり、転化率は 6 時間で 100%に達した。このことから、キトサンビーズよりも大幅に比表面積の小さなキトサン粉末を用いても 4TPP を除去できることがわかった。また、キトサン溶液を加えると、アミノ基濃度の比が [NH<sub>2</sub>]/[4TPP]=1.75 のときに吸光度は最も低くなった。しかし、この濃度での経時変化を調べると、24 時間攪拌させても吸光度は 0.054 となり完全に除去することはできなかった。これらの結果をまとめると、キトサンビーズまたは粉末を用いて不均一系で行うと除去時間を短くし、高い除去効果が得られることがわかった。

### 【結論】

上記の結果から、PPOにより4TPPをキノン酸化できたことが確認された。また、キトサンビーズを加えると、酵素反応によって形成したキノンがキトサンに吸着し、溶液中から4TPPを除去できた。さらに、同じ条件で他のアルキルフェノール類の除去を行った結果、今回用いたアルキルフェノール類において酵素によりキノンに転化され、キトサンへの吸着が可能であることがわかった。除去する際にはキトサン溶液による均一系より、キトサンビーズやキトサン粉末を用いた不均一系での除去の方が効果的であった。

### 【参考文献】

- 1) Y. Kimura, A. Takahashi, A. Kashiwada, K. Yamada, *Environ. Technol.*, **36**, 2265-2277 (2015).
- 2) 高橋あゆみ, 木村悠二, 柏田歩, 山田和典, キチン・キトサン研究, **20**, 16-23 (2014).
- 3) M. Jiménez, F. García-Carmona, *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33-39 (1996).