環境配慮型洗濯におけるペルオキシダーゼを用いた染料退色反応

東 輝*・森田 みゆき*,#

Decolorization Reaction of Dye Using Peroxidase in Eco-Friendly Washing

Akira Higashi and Miyuki Morita*,#*

Hokkaido University of Education Sapporo, Ainosato 5-3-1, Kita-ku, Sapporo 002-8502, Japan

Abstract: In recent years, eco-friendly washing was spread and neutralization of the washing bath and reduction of bath ratio is in progress. Since there is a possibility that dye transfer occurs during washing, decolorization reaction of dye catalyzed by peroxidase was examined to correspond to eco-friendly washing.

Decolorization conditions that dye transfer of Acid Blue 113 and Direct Blue 71 using 3.4×10^{-8} M horseradish peroxidase (HRP) doesn't occur were pH 7.0 Carmody buffer, over 2.5×10^{-5} M hydrogen peroxide and over 1.0×10^{-5} M *p*-iodophenol. Decolorization reaction of both dyes with sodium percarbonate is conventional bleaching agent didn't proceed substantially. So, practical effectiveness of HRP as a detergent added enzyme was confirmed. When the surfactant concentration was $\text{cmc} \times 1.5$, decolorization rate constant was reduced from 10% to 40%.

(Received 21 December, 2013 ; Accepted 27 October, 2014)

1. 緒 言

従来、市販衣料用洗濯洗剤には移染防止や、汚れの分解を主な目的として漂白剤が用いられ、一般的には過炭酸ナトリウムなどの酸素系漂白剤が使用されている。過炭酸ナトリウムの最適反応条件は高温、強アルカリ条件であるが、高温、強アルカリでの洗濯は繊維の脆化を引き起こし[1-2]、高温にするためのエネルギー消費および強アルカリの排水は環境負荷が大きいなどの課題がある。また、高温、強アルカリの条件下以外では、漂白効果が著しく低下し、本来の目的である移染防止や汚れの分解を達成することが出来ない。

さらに、近年、市販衣料用液体洗剤の販売額が粉末洗剤の販売額を上回った。これらの液体洗剤は、環境配慮型として節水(浴比・すすぎ回数抑制)、省エネ、時短などの傾向に向かっており、標準濃度に溶解した時の pH は中性付近になる[3-4]。そのため、過炭酸ナトリウムが液体洗剤に添加された場合、漂白効果は大きく低下することが推測される。さらに、近年の洗濯機の大容量化やドラム式の普及によって洗濯時の低浴比下が進行していると考えられる。このような新しい洗濯方法や洗剤の傾向によって、これまで以上に移染の可能性が高くなると考えられる。

一方、酸化還元酵素であるペルオキシダーゼ(POD)がオレンジ II などの染料を室温、弱アルカリ領域で退色させることが明らかになっている[5-6]。POD を用いた染料分解の基礎的解析として、活性化剤を用いた染料退色速への影響[6-7]や染料の酸化電位の影響[8]、分解機構について検討されており、オレンジ II[9]、Disperse Yellow 3[10]、Trypan Blue[11]などの染料の分解生成物の同定が行われている。また、筆者らは POD の従来型洗濯の移染防止用添加酵素として、温度の影響[12]、洗剤成分の影響[13]、従来の漂白剤の影響[14]、移染防止[15]などについて応用的な検討を行っているが、新しい洗濯様式に対応していない。

従って、本報では低浴比化・中性化の環境配慮型洗濯によって生じる可能性がある移染に対応した POD 系の移染防止について直接染料と酸性染料を用い、検討を行った。また、これらの染料の一部は EMPA 移染モニター用汚染布にも用いられていることから、移染モニター用汚染布の基礎データを得る目的も合わせて検討した。

2. 実 験

2.1 試薬および装置

西洋ワサビ由来 POD(HRP)(和光純薬)の濃度は、モル吸光係数 $1.02 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (403 nm)[16]を用いて算出し、超純水で希釈した。色素は C. I. Acid Blue 113(SIGMA-ALDRICH)、C. I. Direct Blue 71(ACROS ORGANIC)を特

corresponding author

* 北海道教育大学

に精製せずそのまま使用した。両染料の構造を Table 1 に示す。色素の退色速度を増大させる HRP の活性化剤 [17,18] として、*p*-ヨードフェノール(和光純薬、一級)を使用した。界面活性剤はラウリン酸ナトリウムおよびポリオキシエチレン(23)ドデシルエーテル(Brij 35)(和光純薬:化学用)を使用した。その他の試薬は全て和光純薬製試薬特級を使用した。水はイオン交換水を一回蒸留し、超純水処理したものをを用いた。

Table 1 Structure formula of Acid Blue 113 and Direct Blue 71.

Dye	Structure formula
C. I. Acid Blue 113
C. I. Direct Blue 71

吸光度の測定には日立製紫外可視分光光度計 U-2010, 日立 131-0040 温度表示付恒温セルホルダを使用し、光路長 1 cm の石英セルを用いた。

2.2 操作

HRP を用いた染料の退色反応では、石英セルに Carmody 緩衝溶液 1.65 ml, 染料溶液 0.15 ml, 0 M から 1.0×10^{-3} M *p*-ヨードフェノール 0.3 ml, 3.4×10^{-7} M HRP 0.3 ml, 界面活性剤 0.3 ml を加え、 5.0×10^{-4} M から 7.5×10^{-3} M 過酸化水素をインジェクターで 0.3 ml 注入して反応を開始させ、染料の可視部最大吸収波長の吸光度の経時変化を測定した。可視部最大吸収波長は Acid Blue 113 が 535 nm, Direct Blue 71 が 577 nm であった。過炭酸ナトリウムを用いた染料の退色反応では、石英セルに pH 11.5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ 緩衝液 2.25 ml, 染料溶液 0.15 ml, 2.0 M 炭酸ナトリウム 0.3 ml を加え、3.0 M 過酸化水素をインジェクターで 0.3 ml 注入して反応を開始させた。反応温度は 20 °C とした。図および表中の試薬濃度はいずれも終濃度を示す。

3. 結果および考察

3.1 HRP を用いた染料退色反応の最適化

3.1.1 pH の影響

Fig. 1 に Acid Blue 113 および Direct Blue 71 の HRP を用いた退色曲線を示す。反応初期は一次反応であるので、次式を用いて両染料の退色反応における退色速度定数 k を算出した。

$$\ln(C_0/C_t) = k \cdot t \quad (1)$$

ここで、 k (min^{-1}) は退色速度定数、 C_0 は染料の初濃度、 C_t

は反応時間 t における染料の濃度である。HRP を用いた Acid Blue 113 および Direct Blue 71 の退色速度定数における pH の影響について検討した。HRP の Compound I, Compound II と酸化還元反応する Orange G や Alizarin Red S, Reactive Blue 2 などは *p*-ヨードフェノールを共存させることで退色反応が速やかに進行し、退色速度定数が著しく増大する [17,18]。そこで、Acid Blue 113 および Direct Blue 71 においても *p*-ヨードフェノールの有無における pH の影響について検討した。結果を Fig. 2 に示す。Acid Blue 113 の場合、退色速度定数は、*p*-ヨードフェノール非共存時に pH 4.5 で最大となった ($k = 1.42 \text{ min}^{-1}$)。 *p*-ヨードフェノール共存時の退色速度定数は、pH 7.5 で最大となった ($k = 17.1 \text{ min}^{-1}$)。Direct Blue 113 の場合、*p*-ヨードフェノール共存時は pH 4.5 ($k = 9.63 \text{ min}^{-1}$)、*p*-ヨードフェノール非共存時は pH 4.0 ($k = 0.306 \text{ min}^{-1}$) で退色速度定数が最大となった。*p*-ヨードフェノールを共存させることで退色速度定数が最大となる pH は酸性から中性側にシフトし、退色速度定数は、Acid Blue 113 で 12.0 倍、Direct Blue 71 で 31.5 倍となった。

以上より、*p*-ヨードフェノールを共存させることで反応速度定数の極大値を示す pH は酸性から中性へ大きくシフトすることがわかった。近年使用量が急増している液体洗剤の標準使用濃度での pH はおよそ 7 前後である [3-4] ことから、中性液体洗剤用漂白剤としての可能性があることが明らかとなった。

Fig. 1 Decolorization curve of Acid Blue 113 and Direct Blue 71.

[Buffer] = pH 4.0 Carmody, [HRP] = 3.4×10^{-8} M, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 7.5 \times 10^{-4}$ M, 20 °C, Acid Blue 113 : ([Acid Blue 113] = 2.0×10^{-5} M), Direct Blue 71 : ([Direct Blue 71] = 3.8×10^{-5} M).

3.1.2 過酸化水素濃度の影響

次に、Acid Blue 113 および Direct Blue 71 の退色反応における過酸化水素濃度の影響を検討した。過酸化水素の濃度は 5.0×10^{-5} M から 7.5×10^{-3} M とした。Fig. 3 に退色速度定数に及ぼす過酸化水素濃度の影響を示す。いずれも過酸化水素濃度上昇とともに退色速度定数が増大し、

2.5×10^{-4} M 以上ではほぼ一定になった。退色率も同様の結果となった。一方、過酸化水素が高濃度になると POD は Compound III となり [19], POD 反応は阻害される [20] が、過酸化水素濃度 7.5×10^{-3} M まで退色速度定数がほぼ一定になっていることから染料退色反応は阻害されていないと推測される。

3.1.3 *p*-ヨードフェノール濃度の影響

次に、Acid Blue 113 および Direct Blue 71 退色反応における *p*-ヨードフェノール濃度の影響について検討した。*p*-ヨードフェノール濃度は 0 M から 1.0×10^{-4} M の範囲とした。Fig. 4 に退色速度定数および反応開始 5 分後の退色率に及ぼす *p*-ヨードフェノール濃度の影響を示す。両染

料ともに *p*-ヨードフェノール濃度の上昇とともに退色速度定数が増大し、 5.0×10^{-5} M 以上で退色速度定数がほぼ一定となった。我々はオレンジ II の退色速度定数が 2.0 min^{-1} 以上で繊維への移染を防止できることを明らかにしている [15]。本研究で 2.0 min^{-1} 以上の退色速度定数が得られる *p*-ヨードフェノール濃度は 1.0×10^{-5} M 以上であった。退色率は両染料ともに *p*-ヨードフェノール濃度の上昇とともに増大し、Acid Blue 113 は *p*-ヨードフェノール濃度 1.0×10^{-5} M 以上、Direct Blue 71 は 2.5×10^{-5} M 以上でいずれも 75% 以上の退色率でほぼ一定となったことから、吸収スペクトルの経時変化を調べた。Acid Blue 113 の結果を Fig. 5 に示す。Acid Blue 113 固有の可視部吸収

Fig. 2 Effect of pH on decolorization rate constant of Acid Blue 113 and Direct Blue 71. [Buffer] = Carmody, [HRP] = 3.4×10^{-8} M, [H_2O_2] = 7.5×10^{-4} M, 20 °C, (a) : Acid Blue 113 ([Acid Blue 113] = 2.0×10^{-5} M), (b) : Direct Blue 71 ([Direct Blue 71] = 3.8×10^{-5} M), ● : With *p*-iodophenol ([*p*-iodophenol] = 5.0×10^{-5} M), ■ : No *p*-iodophenol.

Fig. 3 Effect of H_2O_2 concentration on decolorization rate constant of Acid Blue 113 and Direct Blue 71. [Buffer] = pH 7.0 Carmody, [HRP] = 3.4×10^{-8} M, [*p*-iodophenol] = 5.0×10^{-5} M, 20 °C, ● : Acid Blue 113 ([Acid Blue 113] = 2.0×10^{-5} M), ■ : Direct Blue 71 ([Direct Blue 71] = 3.8×10^{-5} M).

Fig. 4 Effect of *p*-iodophenol concentration on decolorization rate constant and decolorization efficiency of Acid Blue 113 and Direct Blue 71. [Buffer] = pH 7.0 Carmody, [Acid Blue 113] = 2.0×10^{-5} M, [Direct Blue 71] = 3.8×10^{-5} M, [HRP] = 3.4×10^{-8} M, [H_2O_2] = 7.5×10^{-4} M, 20 °C, Acid Blue 113 ; ● : k , ○ : Decolorization efficiency, Direct Blue 71 ; ■ : k , □ : Decolorization efficiency.

Fig. 5 Absorption spectra in the process of decolorization of Acid Blue 113.

[Buffer] = pH 7.0 Carmody, [Acid Blue 113] = 2.0×10^{-5} M, [HRP] = 3.4×10^{-8} M, [*p*-iodophenol] = 5.0×10^{-5} M, [H_2O_2] = 7.5×10^{-4} M, 20 °C.

ピーク 535 nm は反応時間 10 秒で消失していることから、反応時間 10 秒で染料の共役結合は切れていると推測される。しかしながら、染料の可視部吸収ピークの消失と同時に 400 nm 付近に吸収ピークを持つ反応生成物が確認された。そのため、測定波長と反応生成物の吸収が重なり、退色率が低くなったと考えられる。また、400 nm 付近に吸収ピークを持つ反応生成物の吸収は徐々に低下しているため、反応生成物がさらにゆっくりと分解していると考えられる。Direct Blue 71 についても Acid Blue 113 と同様の結果が得られた。

以上より、低浴比化・中性化の洗濯における移染防止を目的とした場合、 3.4×10^{-8} M HRP での Acid Blue 113 および Direct Blue 71 の退色反応は pH 7.0 Carmody 緩衝液、過酸化水素濃度 2.5×10^{-4} M 以上、*p*-ヨードフェノール濃度 1.0×10^{-5} M 以上が望ましいと考えられる。

一方、従来の漂白剤である過炭酸ナトリウムを用いた Acid Blue 113 および Direct Blue 71 の退色を行い、比較した。過炭酸ナトリウムは酸化力が弱いので、高温でなければ酸化反応が速やかに進行しない。そのため、反応温度を 20 °C から 40 °C まで変化させて退色反応の検討を行ったところ、退色は全く進行しなかった。従って、*p*-ヨードフェノール共存 HRP を用いた退色反応の有効性が明らかとなった。

3.2 界面活性剤添加の影響

移染防止剤として洗剤へ HRP を添加することを考えた場合に、界面活性剤の影響について検討しておく必要がある。そのため、Acid Blue 113 および Direct Blue 71 の退色反応系に界面活性剤として陰イオン界面活性剤のラウリン酸ナトリウムと非イオン界面活性剤の Brij 35 を添加し、両染料の退色反応に及ぼす影響を検討した。ラウリン酸ナトリウムおよび Brij 35 の cmc は 1.1×10^{-2} M、 6.0×10^{-5} M であるので、本反応系では界面活性剤の濃度

を cmc の 0 倍から 3.0 倍の範囲とした。

Fig. 6 に退色速度定数に及ぼす界面活性剤濃度の影響を示す。いずれの染料および界面活性剤の組み合わせも濃度上昇とともに退色速度定数は減少し、Acid Blue 113 にラウリン酸ナトリウムを cmc の 1.5 倍添加することで退色速度定数の減少率は 12.6% ($k = 9.43 \text{ min}^{-1}$)、Brij 35 を cmc の 1.5 倍添加することで 21.8% ($k = 8.43 \text{ min}^{-1}$)、Direct Blue 71 はそれぞれ 38.3% ($k = 4.88 \text{ min}^{-1}$)、22.5% ($k = 6.13 \text{ min}^{-1}$) となった。界面活性剤の添加による反応速度に及ぼす影響について、さらに検討が必要である。

4. 総括

酸性染料 Acid Blue 113 および直接染料 Direct Blue 71 を用いた HRP による退色反応について、環境配慮型洗濯における移染防止剤としての実用化を目的として検討した。両染料とも *p*-ヨードフェノールを共存することで退色速度定数が大きく上昇した。液体洗剤への添加剤としての応用を考慮し、緩衝液を 7.0 Carmody 緩衝液とした。また、過酸化水素濃度 2.5×10^{-4} M、*p*-ヨードフェノール濃度 1.0×10^{-5} M 以上で移染を防止できる退色速度定数が得られることが明らかとなった。反応中間生成物が 400 nm に吸収を持つため退色率は 80 % を下回ったが、染料の最大吸収波長のピークが消失していることから、両染料共に分解反応は進行していることがわかった。また、過炭酸ナトリウムを用いた Acid Blue 113 および Direct Blue 71 の退色反応を HRP 系と比較したところ、過炭酸ナトリウムによる退色反応はほとんど進行しなかった。従って、液

Fig. 6 Effect of surfactant concentration on decolorization rate constant of Acid Blue 113 and Direct Blue 71.

[Buffer] = pH 7.0 Carmody, [HRP] = 3.4×10^{-8} M, [*p*-iodophenol] = 5.0×10^{-5} M, [H_2O_2] = 7.5×10^{-4} M, 20 °C, ●: Acid Blue 113 / Brij 35 ([Acid Blue 113] = 2.0×10^{-5} M), ○ Acid Blue 113 / Sodium laurate ([Acid Blue 113] = 2.0×10^{-5} M), ■: Direct Blue 71 / Brij 35 ([Direct Blue 71] = 3.8×10^{-5} M), □: Direct Blue 71 / Sodium laurate ([Direct Blue 71] = 3.8×10^{-5} M).

体洗剤の移染防止剤としての HRP の添加有効性が見出された。

ラウリン酸ナトリウムおよび Brij 35 を Acid Blue 113 および Direct Blue 71 の退色反応に添加した場合、両染料とも、界面活性剤濃度の上昇とともに退色速度定数が低下した。cmc の 1.5 倍濃度を添加することで、退色速度定数が約 10% から 40% 低下した。

本研究の一部は科研費・基盤研究(A) (23240101) の助成を受けたものである。

文 献

1. M. Morita, E. Komatsu, T. Kamidate and H. Watanabe, *Sen'i Gakkaishi*, **53**, 471 (1997).
2. R. Ohura, *J. of Home Economics of Japan*, **40**, 913 (1989).
3. A. Higashi and M. Morita, *Journal of Hokkaido University of Education (Natural Science)*, **63**, 1 (2013).
4. M. Sasaki and M. Fuji, *Journal of Tokyo Kasei Gakuin University*, **52**, 33 (2012).
5. M. Morita, R. Ito, T. Kamidate and H. Watanabe, *Text. Res. J.* **66**, 470 (1996).
6. M. Morita, T. Kamidate, T. Shibata and H. Watanabe, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46**, 807 (1997).
7. M. Morita, T. Watanabe and A. Higashi, *Sen'i Gakkaishi*, **69**, 147 (2013).
8. T. Kamidate, T. Shibata, H. Watanabe and M. Morita, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **48**, 497 (1999).
9. M. Morita, E. Yamaguchi, E. Komatsu, R. Ito, T. Kamidate and H. Watanabe, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **48**, 793 (1999).
10. J. T. Spadaro and V. Renganathan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 301 (1994).
11. U. Kalsoom, S. S. Ashraf, M. A. Meetani, M. A. Raul and H. N. Bhatti, *Chemistry Central Journal* **93**, 7 (2013).
12. A. Higashi and M. Morita, *Sen'i Gakkaishi*, **70**, 100 (2014).
13. M. Morita, E. Yamaguchi, T. Kamidate and H. Watanabe, *Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46**, 573 (1997).
14. M. Morisaki, M. Morita and T. Watanabe, *Sen'i Gakkaishi*, **66**, 56 (2010).
15. M. Morita, E. Komatsu, T. Kamidate and H. Watanabe, *Sen'i Gakkaishi*, **53**, 289 (1997).
16. B. B. Kim, V. V. Pisarev and A. M. Egorov, *Anal. Biochem.*, **199**, 1 (1991).
17. M. Morita, T. Kamidate, T. Shibata and H. Watanabe, *J. Jpn. Oil Chem.*, **46**, 807 (1997).
18. E. Komatsu and M. Morita, *Bulletin of Tenshi College*, **1**, 45 (2001).
19. R. Nakajima and I. Yamazaki, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2576 (1987).
20. S. X. Chen and P. Schopfer, *Eur. J. Biochem.*, **260**, 726 (1999).