低温下におけるペルオキシダーゼを用いたオレンジⅡ退色反応の活性化

東 輝*・森田 みゆき*,#

Activation of Orange II Decoloration Reaction with Peroxidase Under Low Temperature

Akira Higashi* and Miyuki Morita*,#

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

Abstract : Decoloration of Orange II catalyzed horseradish peroxidase (HRP) with activator as *p*-iodophenol, sodium nonanoyloxybenzenesulphonate (NOBS) and sodium *p*-phenolsulfonate under low temperature was studied kinetically. Decoloration rate constant (k) that can prevent dye transfer of Orange II ($k = 2.0 \text{ min}^{-1}$) was not obtained in $3.4 \times 10^{-8} \text{ M}$ HRP without activator. Optimum condition using *p*-iodophenol was pH 8.9 Carmody buffer and $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ *p*-iodophenol. Optimum pH using NOBS and sodium *p*-phenolsulfonate were 10.1 and 10.3 respectively. Decoloration rate constant decreased with increase in the concentration NOBS. $k = 2.0 \text{ min}^{-1}$ was not reached unless high sodium *p*-phenolsulfonate. Therefore, it was found that the use of *p*-iodophenol appears optimal.

Decoloration reaction of Orange II using HRP with *p*-iodophenol and sodium percarbonate to prevent dye transfer was optimized under low temperature. The activation energy of decoloration of Orange II using HRP with *p*-iodophenol was 1/2 – 1/3 of those without activator and using sodium percarbonate.

(Received 24 September, 2013 ; Accepted 28 January, 2014)

1. 緒 言

市販衣料用洗濯洗剤には移染防止や、汚れの分解を目的として漂白剤を含有しているものがある。一般的には酸素系漂白剤の一つである過炭酸ナトリウムが用いられており、過炭酸ナトリウムを用いた染料の分解反応[1]や、酸素系漂白剤の染料退色機構の解析が行われている[2-3]。過炭酸ナトリウム最適反応条件は高温、強アルカリであるため、最適条件下では繊維の脆化[4-5]などの課題がある。さらに、最適条件以外では反応速度も比較的遅いため、移染防止は難しい。

また、衣料用洗剤には洗浄力を高め、環境負荷の低減を目的として酵素を添加しているものがある。添加されているプロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼなどの酵素はタンパク質や脂質、デンプンを主に分解する[6]。我々は、酸化還元酵素であるペルオキシダーゼ(POD)が室温、弱アルカリ領域で染料を素早く退色させることを見出した[7-8]。さらに、PODへの洗剤成分の添加の影響[9]や、移染防止について[10]洗剤添加用酵素としての実用化の検討を行ってきた。

一方、北海道などの寒冷地における冬季の洗濯は、液温が夏季と比較して大きく低下すると考えられる。その

ため、PODを洗剤添加用酵素として使用するならば、低温下でも染料退色反応が進行する必要がある。

そこで、本研究では、低温下での染料の退色反応を活性化させることを目的として、西洋ワサビ由来POD(HRP)の活性化剤として用いられている

p-ヨードフェノール、過炭酸ナトリウムの漂白活性化剤を用いて、低温下におけるオレンジⅡ退色反応の活性化について検討した。

2. 実 験

2.1 試薬および装置

西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)(和光純薬)の濃度は、モル吸光係数 $1.02 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ (403 nm) [11]を用いて算出し、超純水で希釈して使用した。色素はオレンジⅡ(関東化学、鹿1級)を特に精製せずそのまま使用した。活性化剤として、*p*-ヨードフェノール(和光純薬、一級)、ノナノイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム(NOBS、常法により合成)、*p*-フェノールスルホン酸ナトリウム二水和物(和光純薬)を使用した。その他の試薬は全て試薬特級を使用した。水はイオン交換水を一回蒸留し、ミリポアで超純水処理したものをを用いた。

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。

corresponding author

* 北海道教育大学

2.2 操作

HRP を用いたオレンジ II の分解反応では、石英セルに pH5.5 から 12.0 Carmody 緩衝溶液または pH9.0 Tris/HCl 緩衝溶液 $1.95 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ 、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ オレンジ II $0.15 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ 、活性化剤 $0.3 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ 、 $3.4 \times 10^{-7} \text{ MHRP}$ $0.3 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ を加え、攪拌の後、過酸化水素をインジェクターで $0.3 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ 注入して反応を開始させた。過炭酸ナトリウムを用いたオレンジ II の分解反応では、石英セルに pH 11.5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ 緩衝液を $2.25 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ 、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ オレンジ II $0.15 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ 、2.0 M 炭酸ナトリウム $0.3 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ を加え、攪拌し、3.0 M 過酸化水素をインジェクターで $0.3 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ 注入して反応を開始させた。両分解反応ともオレンジ II の最大吸収波長(485 nm)の吸光度の経時変化を測定した。反応温度は 5 から 20℃ とした。また、図および表中の試薬濃度はいずれも終濃度を示す。

HRP のオレンジ II の退色反応は擬一次反応であることが確認されている[8]。そのため、色素の退色曲線から以下の擬一次反応速度式を用いて色素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、 $k(\text{min}^{-1})$ は退色速度定数、 C_0 はオレンジ II の初濃度、 C_t は反応時間 t におけるオレンジ II の濃度である。

3. 結果および考察

3.1 活性化剤を用いたオレンジ II 退色反応の活性化

HRP を用いたオレンジ II 退色反応における各温度の影響を Fig. 1 に示す。本研究は洗剤用添加酵素としての実用化を目的としているため、使用する酵素の量を低減させる必要がある。本研究では HRP の濃度を前報[12]で用いた HRP 濃度に対し、1/10 の $3.4 \times 10^{-8} \text{ M}$ とした。 $3.4 \times$

Fig. 1 Effect of temperature on decoloration curve of Orange II.

[Buffer] = pH 9.0 Tris/HCl, [Orange II] = $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, [HRP] = $3.4 \times 10^{-8} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 7.5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

10^{-8} MHRP , pH 9.0 Tris/HCl 緩衝液で反応させたところ、反応温度が低下するに従い、反応速度が低下した。そのため、移染防止、5℃での退色反応の活性化のために退色条件の最適化が必要であることがわかった。

まず、20℃での各種活性化剤の効果を検討した。

HRP を用いたオレンジ II 退色反応で、各活性化剤共存及び非共存下における pH の影響を検討した。既報をもとに p -ヨードフェノールの濃度は、 $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ [13]、NOBS の濃度は $6.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ [12]とした。 p -フェノールスルホン酸ナトリウムは、NOBS と過酸化水素が反応し、NOBS と等量の p -フェノールスルホン酸ナトリウムが発生するため、NOBS と同濃度の $6.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ とした。

Fig. 2 に結果を示す。Carmody 緩衝液を用いた場合、活性化剤添加、非添加に関わらず pH 上昇と共に退色速度定数が増加した。活性化剤非共存時に pH 10.3 ($k = 0.214 \text{ min}^{-1}$)、 p -ヨードフェノール共存時に pH 8.9 ($k = 4.44 \text{ min}^{-1}$)、NOBS 共存時に pH 10.1 ($k = 0.198 \text{ min}^{-1}$)、 p -フェノールスルホン酸ナトリウム共存時に pH 10.3 ($k = 0.215 \text{ min}^{-1}$)でそれぞれ退色速度定数が最大となった。活性化剤を添加することで HRP と反応する水素供与体がオレンジ II から活性化剤に置き代わった。HRP に対する水素供与体へのなりやすさ、すなわち、ラジカル生成のしやすさは、酸化還元電位及び酸解離定数に依存するため[14]、よりラジカルになりやすい活性化剤を共存することで最適 pH が変化したと考えられる。前報[10]で移染防止可能な反応速度定数は 2.0 min^{-1} であることを明らかにしているが、 p -ヨードフェノールを共存させることで最大退色速度定数 4.44 min^{-1} となった。活性化剤非共存時、NOBS 及び p -フェノールスルホン酸ナトリウム共存時は

Fig. 2 Effect of pH on decoloration rate constant of Orange II.

[Buffer] = Carmody, [Orange II] = $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, [HRP] = $3.4 \times 10^{-8} \text{ M}$, 20℃, ● : No activator ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 7.5 \times 10^{-4} \text{ M}$), ■ : With p -iodophenol ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 7.5 \times 10^{-4} \text{ M}$, [p -iodophenol] = $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$), ◆ : With NOBS ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 3.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, [NOBS] = $6.7 \times 10^{-4} \text{ M}$), ▲ : With sodium p -phenolsulfonate ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 3.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, [sodium p -phenolsulfonate] = $6.7 \times 10^{-4} \text{ M}$).

$k=2.0\text{ min}^{-1}$ 以下であった。 *p*-ヨードフェノールを添加することで、最適 pH が中性側にシフトし、退色速度定数が 20.7 倍となり、オレンジ II 退色反応が活性化された。 NOBS, *p*-フェノールスルホン酸ナトリウムを添加した場合は、最適 pH はほとんど変化なく、退色速度定数はむしろわずかに低下した。

以上より、最適 pH は *p*-ヨードフェノール共存時は pH 8.9 Carmody 緩衝液、NOBS 共存時は pH 10.1 Carmody 緩衝液、*p*-フェノールスルホン酸ナトリウム共存時は pH 10.3 Carmody 緩衝液とした。

次に、オレンジ II 退色反応における活性化剤濃度の影響について検討した。 Fig. 3 に退色曲線を示す。 *p*-ヨードフェノールの濃度の増大と共にオレンジ II がすみやかに退色した。 しかし、 $7.0\times 10^{-5}\text{ M}$ から $9.0\times 10^{-5}\text{ M}$ にかけて

Fig. 3 Effect of *p*-iodophenol concentration on decoloration curve of Orange II.

[Buffer] = pH 8.9 Carmody, [Orange II] = $5.0\times 10^{-5}\text{ M}$, [HRP] = $3.4\times 10^{-8}\text{ M}$, [H_2O_2] = $7.5\times 10^{-4}\text{ M}$, 20°C , [*p*-iodophenol] ● : 0 M, ■ : $1.0\times 10^{-6}\text{ M}$, ◆ : $5.0\times 10^{-6}\text{ M}$, ▲ : $3.0\times 10^{-5}\text{ M}$, ▼ : $5.0\times 10^{-5}\text{ M}$, ○ : $7.0\times 10^{-5}\text{ M}$, □ : $1.0\times 10^{-4}\text{ M}$.

反応開始 20 秒までの変化の割合が小さくなった。 *p*-ヨードフェノール濃度 $9.0\times 10^{-5}\text{ M}$ で退色速度定数が最大 ($k=5.33\text{ min}^{-1}$) となり、 $1.0\times 10^{-4}\text{ M}$ で減少した。 一方、退色反応開始 5 分後のオレンジ II 残留率は *p*-ヨードフェノール濃度増大と共に減少するが、 $7.0\times 10^{-5}\text{ M}$ *p*-ヨードフェノール以上では残留率が増大した。 HRP 及び *p*-ヨードフェノールを含む溶液に過酸化水素を添加すると、*p*-ヨードフェノールの酸化生成物が発生し、オレンジ II の測定波長付近にも吸収を有することから[13]、同様の酸化生成物が生成し、485 nm の吸光度が上昇したと考えられる。従って、*p*-ヨードフェノールの最適濃度を $5.0\times 10^{-5}\text{ M}$ とした。

オレンジ II 退色速度定数における NOBS 濃度及び *p*-フェノールスルホン酸ナトリウムの影響を Fig. 4 に示す。 NOBS を共存させた場合、 $5.0\times 10^{-3}\text{ M}$ までは退色速度定数の変化はなかったが、 $1.0\times 10^{-2}\text{ M}$ 以上では退色速度定数が大きく低下した。 一方で、*p*-フェノールスルホン酸ナトリウムは濃度増大と共に退色速度定数が上昇し、 $5.0\times 10^{-3}\text{ M}$ では *p*-フェノールスルホン酸ナトリウム非共存時の 11.3 倍となった。 モミガラ由来 POD(RPO)を用いた NOBS 共存下でのオレンジ II の退色反応では NOBS が過酸化水素によって *p*-フェノールスルホン酸ナトリウムと有機過酸に分解され、*p*-フェノールスルホン酸ナトリウムが RPO の活性化剤として作用し、退色反応を促進していることを明らかにした[13]。 しかし、HRP と NOBS を共存させた場合、オレンジ II の退色速度定数は増加しなかった。 また、*p*-フェノールスルホン酸ナトリウムを共存した場合、濃度上昇と共に退色速度定数が上昇したが、*p*-ヨードフェノールを添加した場合と比較すると反応が遅かった。

以上から、 $3.4\times 10^{-8}\text{ M}$ HRP を用いたオレンジ II の退色反応の活性化には、 $5.0\times 10^{-5}\text{ M}$ *p*-ヨードフェノールを最適条件とした。

Fig. 4 Effect of activator concentration on decoloration rate constant of Orange II.

[Orange II] = $5.0\times 10^{-5}\text{ M}$, [HRP] = $3.4\times 10^{-8}\text{ M}$, [H_2O_2] = $3.0\times 10^{-3}\text{ M}$, 20°C , (a) : With NOBS ([Buffer] = pH 10.1 Carmody), (b) : With sodium *p*-phenolsulfonate ([Buffer] = pH 10.3 Carmody).

3.2 低温下におけるオレンジⅡ退色反応の活性化

5℃におけるオレンジⅡ退色反応の最適化のため *p*-ヨードフェノール濃度について検討した。結果をFig.5に示す。*p*-ヨードフェノール濃度を0Mから 1.0×10^{-4} Mまで変化させたところ、 9.0×10^{-5} Mで二量体と推測される沈殿物が生じた。従って、 9.0×10^{-5} Mで退色速度定数が最大となり、時間経過によるオレンジⅡ残留率の増大も見られなかったことから、*p*-ヨードフェノール最適濃度を 9.0×10^{-5} Mと決定した。

次にオレンジⅡ退色反応における反応温度の影響についてHRP系への*p*-ヨードフェノール共存の有無、および過炭酸ナトリウムを用いた場合で検討した。いずれも温度上昇と共に退色速度定数は増加した。5℃の条件下における退色速度定数は、活性化剤非共存時に 0.0270 min^{-1} 、過炭酸ナトリウムを用いた場合には 0.0492 min^{-1} となり、オレンジⅡ移染防止が可能な退色速度定数は得られなかったが、*p*-ヨードフェノール共存時には、退色速度定数は 3.58 min^{-1} となった。従って、 3.4×10^{-8} M HRPに 9.0×10^{-5} M *p*-ヨードフェノールを共存させることによって低温下でもオレンジⅡ退色反応が速やかに進行することがわかった。

Fig.6に退色速度定数のアレニウスプロット、Table1に活性化エネルギーを示す。 9.0×10^{-5} M *p*-ヨードフェノールを共存した 3.4×10^{-8} M HRPを用いた場合、活性化エネルギーは 18.0 kJ/mol となった。同様に活性化剤非共存HRP

で 52.1 kJ/mol 、 0.2 M 過炭酸ナトリウムで 40.0 kJ/mol となったことから、 9.0×10^{-5} M *p*-ヨードフェノールを共存させることでオレンジⅡ退色反応が活性化されたことがわかった。

4. 総括

低温下におけるHRP及び各種POD活性化剤共存系を用いてオレンジⅡ退色反応の活性化について速度論的に検討した。HRPに*p*-ヨードフェノールを共存させた場合、最適pHはpH 8.9 Carmody緩衝液、最適*p*-ヨードフェノール濃度は 5.0×10^{-5} Mとなった。*p*-ヨードフェノール 7.0×10^{-5} M以上では酸化生成物と思われる物質が生成すると推測された。HRPにNOBSを共存させた場合、最適pHはpH 10.1 Carmody緩衝液となった。NOBSの濃度を増大させると、 1.0×10^{-2} M以上でオレンジⅡ退色速度定数が大きく低下した。*p*-フェノールスルホン酸ナトリウムを共存させた場合、最適pHはpH 10.3 Carmody緩衝液となった。*p*-フェノールスルホン酸ナトリウム濃度上昇と共にオレンジⅡ退色速度定数が増加したが、*p*-ヨードフェノールよりも高濃度でなければ反応が速やかに進行しなかった。従って、HRPのオレンジⅡ退色反応には、*p*-ヨードフェノールを使用することが最適と考えられた。

Fig. 5 Effect of *p*-iodophenol concentration on decoloration rate constant of Orange II. [Buffer] = pH 8.9 Carmody, [Orange II] = 5.0×10^{-5} M, [HRP] = 3.4×10^{-8} M, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ = 7.5×10^{-4} M, 5℃.

Fig. 6 Arrhenius plot of decoloration of Orange II. [Orange II] = 5.0×10^{-5} M, ● : HRP + *p*-iodophenol ([Buffer] = 8.9 Carmody, [HRP] = 3.4×10^{-8} M, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ = 7.5×10^{-4} M, [*p*-iodophenol] = 9.0×10^{-4} M), ■ : HRP ([Buffer] = 8.9 Carmody, [HRP] = 3.4×10^{-8} M, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ = 7.5×10^{-4} M), ◆ : Sodium percarbonate ([Buffer] = pH 11.5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$, $[\text{Na}_2\text{CO}_3]$ = 0.2 M , $[\text{H}_2\text{O}_2]$ = 0.3 M).

Table 1 Activation energy and correlation coefficient.

Detergent	Activation energy (kJ mol^{-1})	R^2
HRP + <i>p</i> -iodophenol	18.0	0.973
HRP	52.1	0.988
Sodium percarbonate	40.0	0.979

HRP 系における *p*-ヨードフェノール共存及び過炭酸ナトリウムを用いて 5℃ でオレンジ II 退色反応を試みた結果, $9.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ *p*-ヨードフェノール共存 HRP ではオレンジ II の退色速度定数は 3.58 min^{-1} となり, 移染防止が可能であることがわかった. この時の退色率は減少しなかったことから最適濃度を $9.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ とした. また, *p*-ヨードフェノール共存時の活性化エネルギーは活性化剤非共存, 過炭酸ナトリウムの約 1/2 から 1/3 となった.

文 献

1. R. Ohura, A. Katayama and T. Takagishi, *Text. Res. J.* **62**, 552 (1992).
2. T. Tamura, T. Kubozono, M. Tamura and H. Yoshimura, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **44**, 1086 (1995).
3. T. Tamura, T. Kubozono, M. Tamura and H. Yoshimura, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **44**, 1093 (1995).
4. M. Morita, E. Komatsu, T. Kamidate and H. Watanabe, *Sen'i Gakkaishi*, **53**, 471 (1997).
5. R. Ohura, *J. of Home Economics of Japan*, **40**, 913 (1989).
6. Y. Suzuki, *Jpn. Res. Assn. Text. End-Uses*, **54**, 319 (2013).
7. M. Morita, T. Kamidate, T. Shibata and H. Watanabe, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46**, 807 (1997).
8. M. Morita, R. Ito, T. Kamidate and H. Watanabe, *Text. Res. J.*, **66**, 470 (1996).
9. M. Morita, E. Yamaguchi, T. Kamidate and H. Watanabe, *Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46**, 573 (1997).
10. M. Morita, E. Komatsu, T. Kamidate and H. Watanabe, *Sen'i Gakkaishi*, **53**, 289 (1997).
11. B. B. Kim, V. V. Pisarev and A. M. Egorov, *Anal. Biochem.*, **199**, 1 (1991).
12. M. Morita, T. Watanabe and A. Higashi, *Sen'i Gakkaishi*, **69**, 147 (2013).
13. T. Kamidate, T. Shibata, H. Watanabe and M. Morita, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **47**, 1345 (1998).
14. M. Morita, K. Takada, M. Morisaki and E. Komatsu, *Sen'i Gakkaishi*, **64**, 125 (2008).