ペルオキシダーゼの反応特性と漂白プロセス

Reaction Characteristic and Bleaching Process of Peroxidase

森田 みゆき

北海道教育大学
〒002-8501
札幌市北区あいの里 5-3-1

Miyuki MORITA
Hokkaido University of Education
5-3-1, Ainosato, Kita-ku, Sapporo, 002-8501, Japan

論文要旨:酸化還元酵素であるペルオキシダーゼを環境に配慮した繊維加工や洗浄配合剤へ利用するため、熱耐性、溶媒への耐性、pH 特性、反応の活性化などを検討した。ペルオキシダーゼは、広い基質特異性を有する。広い pH 範囲で種々の水素供与体と反応することがわかった。水素供与体との反応速度は、水素供与体の酸化電位によって影響を受けることがわかった。由来の異なるペルオキシダーゼは種々の耐性や反応特性が異なることがわかった。モミガラ由来ペルオキシダーゼは、熱耐性や有機溶媒耐性や過酸化水素耐性に優れていることがわかった。ペルオキシダーゼの由来による耐性の違いや、反応特性の違いを利用して、利用目的に合わせて反応性をコントロールできることを明らかにした。西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼとモミガラ由来ペルオキシダーゼを中心に反応機構についても述べる。

Abstract: The demand for environmentally friendly fiber processing and cleaning formulations prompted us to study the heat resistance, solvent resistance, pH characteristics, and the activation of peroxidases from various sources. Peroxidase has a broad substrate specificity. In a wide pH range, peroxidase was found to react with various hydrogen donor. The rate of reaction with hydrogen donors were found to be influenced by the oxidation potential of the hydrogen donor. Peroxidases from different sources were found to exhibit different stabilities and reaction characteristics. Rice full peroxidase showed excellent resistance towards heat, organic solvent, and hydrogen peroxide. The reaction mechanisms of horseradish peroxidase and rice full peroxidase were studied. Since the peroxidase reaction can be controlled by the reaction conditions, these conditions were proposed to suit the specific application.

Key words: peroxidase, reaction characteristic, decoloration

1 はじめに

繊維基質の漂白や、繊維上に付着した有色物質の漂白には、酸化剤や還元剤を用いて、酸化反応や還元反応による繊維上の有色物質を分解する方法が一般的であり、反応機構も検討されている^{1, 2)}。衣類の多くは、染料で染色されており、それらの繊維に染着した染料を分解することなく、誤って着色した有色物質を漂白作用で分解することも求められている。このような目的のため、酸化剤の中でも過炭酸ナトリウムや過ホウ酸ナトリウムは

酸化反応が穏やかなため、衣類用洗剤にも配合されている。

衣類に用いられている繊維は、天然繊維の綿、麻、羊毛、絹を始めとして、化学繊維のレーヨン、アセテート、ナイロン、ポリエステルなど、多くの高分子物質である。これらの分子の官能基の特徴により、染料との結合の仕方が異なるため、それぞれの繊維に対応した染料が開発され、利用されている。一時期には、染料は4,000品種、銘柄数は25,000品目もあったが、現在は若干減少している。

染色した衣服の色をそのままに維持し、付着した有色物質を分解したり、洗濯時に衣類から離脱した染料で他の衣類が色移りすることなく分解するのは、いかに繊維

連絡者：森田 みゆき
E-mail : morita.miyuki@s.hokkyodai.ac.jp

表面のみで反応を早く進行させるかということが課題となる。

使用頻度の高い酸化漂白剤は、高温、強アルカリ条件下では、反応が早く進行する。しかし、アルカリに耐性のない繊維、綿用の反応染料には適しておらず、エネルギーコストの問題もあった³⁾。

これらの課題の解決のため、酸化還元酵素であるペルオキシダーゼ (POD) の反応の検討を行ってきた。本論では POD を主に漂白剤として利用する場合の反応特性について述べる。

2 酸化還元酵素ペルオキシダーゼの反応性

2・1 ペルオキシダーゼの特徴

POD は、EC.1.11.1.7 に分類される過酸化水素を第一基質として、第二基質である種々の水素供与体の酸化反応を触媒する酸化還元酵素で、動物、植物、菌類、バクテリアなどに広く分布している。POD は、活性部位に Fig. 1 に示すヘム鉄を持ち、POD と水素供与体 (AH) との酸化反応は次式の酵素サイクルで進行することが知られている⁴⁾。

なお、式中の () の数字は活性部位のヘム鉄の見かけの酸化数を示している。native である POD (+3)、およびこれらの中間体の Compound I, Compound II の状態で、ヘム鉄の吸収スペクトルは変化して、Fig. 2 に示すように solet 帯 (または B 帯) (400 nm 付近の極めて強い吸収帯) と、Q 帯 (480 nm~650 nm に弱い吸収帯) で固有のスペクトルとなる⁵⁾。

POD の中で、西洋ワサビ由来 POD (HRP) は最も古

Fig. 1 Ferriprotoporphyry (ferric heme) Activity site.

Fig. 2 Absorption spectra of POD.

くから知られており、分子量は約 4 万で、モル吸光係数は、 $1.02 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ (403 nm) である⁶⁾。過酸化水素 (過酸化水素、過酸化水素メチル、過酸化水素エチル) に対する基質特異性は高いが、第二基質である水素供与体に対する特異性は低いことが知られている。我々は、水素供与体に対する特異性が低いことを利用して、洗剤中の漂白剤として用いる可能性について検討を行った。

2・2 ペルオキシダーゼの反応特性

上述のように、POD は分子内の活性部位に一個のヘム鉄を有することから、POD のモル吸光係数から、POD のモル濃度を求めることができる。一般に酵素の濃度は活性単位で示す事が多いが、ペルオキシダーゼは基質特異性が低いことと、基質により反応速度が異なることから、POD 間、基質間の比較検討には、活性単位を用いることは適さない。従って、ここに示す多くのデータは、POD の濃度をモル濃度として同一濃度で検討した結果を示している。

POD の反応は、由来によって、また第二基質によって、pH の反応性は異なる。Fig. 3 に、HRP による Orange II の退色反応におよぼす pH の影響を示している。緩衝液により、反応速度は異なるが、pH の影響は同じ様な傾向となる。第二基質が異なると、反応速度が極大を示す pH は異なる⁷⁾。第二基質として、Orange I, Orange II, Orange Gなどを比較すると、Fig. 4 に示すように、同じ pH であっても、反応速度が異なる。これは、それぞれの染料の酸化還元電位が異なるためで、酸化還元電位の違いが、POD の酸化還元電位と差の大小と関係するため、酸化還元反応の進行のしやすさに影響を与えると考えられる⁸⁾。また、POD を用いた退色反

Fig. 3 Influence of pH on the decoloration rate constant of Orange II.

Fig. 5 Effect of reaction temperature on the decoloration rate constant of Orange II.

Fig. 4 Rate constant and oxidation-reduction potential of dye.

応は色素の分解に特異性を有し、PODの由来によって退色速度や退色挙動が大きく異なることがわかっており⁹⁾、効率的な色素の退色反応には様々な要因が関与することがわかっている。

2・3 超酵素としてのペルオキシダーゼの可能性

酵素は熱的に不安定であることが多く、熱的に安定であることが要求される。Fig. 5に4種の由来の異なるPODを用いた色素の退色反応における反応温度の影響、Fig. 6に90℃で保存後に80℃で反応した場合の退色曲線を示した。反応温度の影響では、菌由来POD (ARP)は、50℃以上で失活するが、植物由来とするモミガラ由来POD (RPO)、大豆由来POD (SPO)、およびHRPは高温になるほど反応速度は増大した。特に、

RPOの温度効果は著しい結果となった。高温で保存した場合、HRPは保存時間で5分で退色速度は約1/2になったが、RPOは150分保存後も、退色速度はほとんど減少しなかった。

一方、抗菌および防臭などへの消費者の高い関心への対応として、洗濯洗剤に酸素系漂白剤を配合したり、洗濯槽に洗濯洗剤と共に酸素系漂白剤を添加して洗濯する方法を洗剤メーカーが推奨するなど、多様化している。従って、PODを洗濯時に漂白剤として使用するためには、不活化せずに種々の濃度のH₂O₂条件下において、PODを用いた退色反応が安定に進行することはPODの実用化に必要不可欠と言える。

しかし、Arnaoらは、PODの反応で第一基質として必要不可欠であるH₂O₂は、高濃度条件下でPODの不活化をもたらす反応の進行を妨げることを、HRPで明らかにしている¹⁰⁾。そこで、我々は、4種の由来の異なるPODを用いた色素の退色反応におけるH₂O₂濃度の影響や保存安定性などのH₂O₂耐性を調べた¹¹⁾。Soret帯の最大吸収波長の経時変化をFig. 7に示した (RPOを用いた場合を (a)、HRPを用いた場合を (b))。Compound IIIは、HRPの過剰なH₂O₂共存下において発現し、通常反応サイクルと別経路をとるためにHRPの反応阻害に起因することが確認されている¹⁰⁾。また、Compound IVはP-670といわれ、過剰のH₂O₂共存下やサリチル酸とH₂O₂共存下において発現し¹²⁾、酵素反応を阻害することが確認され¹³⁾、さらに、Compound IIIの破壊より、Compound IVが生成される反応連動性があることも明らかになっている¹⁴⁾。RPOは、Soret帯の最

Fig. 6 Storage stability of the PODs at 90°C. (Left : RPO, Right : HRP)

Fig. 7 Absorption spectra of POD. Fig. 7-a is RPO system, Fig. 7-b is HRP system. Silver staining of SDS-PAGE of 12% gel electrophoresis product. The positions of molecular mass standards are indicated on the both sides (SD). (a); H_2O_2 concentration is 0.75 mM, (b) H_2O_2 concentration is 75 mM.

Fig. 8 Proposed mechanism for Orange II by RPO- H_2O_2 and HRP- H_2O_2 bleaching system in the high concentration of H_2O_2 .

大吸収波長変化で示すように、418 nm に吸収を有する Compound IV の酸化状態から、時間の経過とともに最大吸収波長が短波長側に少しずつシフトし、一部分が native (410 nm) の状態に戻る。一方、HRP は、反応開始から 7 時間経過後も Compound III と Compound IV の状態が継続し、native の状態に戻らなかった。また、SDS-PAGE により各 POD のタンパク質を解析した結果、RPO は 75 mM H_2O_2 の共存下においても RPO に由来する約 45 kDa のバンド及びその他のバンド強度が低下しなかった。これらの結果から、高濃度の H_2O_2 共存下における反応スキームは、Fig. 8 のように進行すると考えられる。

さらに、POD を用いた色素の退色反応について、有機溶媒耐性も調べた¹⁵⁾。用いた有機溶媒の種類によってオレンジ II の退色速度は異なり、HRP の酸化状態から、水系と同様に退色速度が速いメタノール／水系では Compound III が発現しないことが確認された。一方、エタノール、2-プロパノールを用いた場合、Compound III が発現し、Orange II の退色を阻害していることが明らかになった。

POD の反応におけるこれらの耐性は、由来により大

きく異なることがわかった。中でも、RPO は、熱、 H_2O_2 、有機溶媒の耐性に優れ、バイオマスとしての有効利用も期待されていることから、超酵素としての可能性が大きいと考えられる。

3 漂白剤としての応用

実際の漂白剤としての応用のため、色素の分解反応スキームを検討した結果を、Fig. 9 に示す。Orange II の退色反応の反応過程を調べたところ、水素供与体である Orange II の還元反応が終了しても、反応溶液のスペクトルはしばらく Compound II のスペクトルであった。さらに、HPLC、TLC などによる検討の結果、Orange II の退色反応は、Fig. 9 の右部分に示すように、Orange II が、まず水素供与体として作用して生成した反応中間体が、さらに次の POD サイクルで水素供与体として作用していると考えられる¹⁶⁾。一方、前述の由来の異なる POD による反応速度の差異は、各 POD の中間体と Orange II との反応速度 (K_2 と K_3) の差によるものと考えられる。

より効率的な漂白系、すなわち色素の退色速度が早く、かつ、どのような化学構造の色素も退色できる漂白系を構築する必要がある。そこで、色素の構造の退色反応への影響を調べたところ、色素により反応速度が大きく異なることがわかった。そこで、いくつかの *p*-置換フェ

ノール誘導体は HRP とルミノールの化学発光反応において増感剤として作用する¹⁷⁾ ことから、化学発光反応の活性化剤のうち *p*-ヨードフェノールを用いて、Orange II と OrangeG の退色反応を行った^{18,19)}。*p*-ヨードフェノールを用いた場合、難分解性のオレンジ G も反応速度が 5.05 min^{-1} と大幅に増大したことから、化学発光反応における増感剤は、色素の分解反応に対しても活性化剤として有効であることがわかった。Fig. 10 に、活性化剤共存と非共存による速度定数を示す。活性化剤を共存させると、極大を示す pH はシフトする²⁰⁾。これは、POD と水素供与体間での酸化還元反応の進行のしやすさ、すなわち、水素供与体の酸乖離定数が異なるためと考えられる。

さらに、HRP-Orange II 反応系にグルコース-グルコースオキシダーゼ (GOD) 反応系をカップリングすることにより、グルコースと GOD との反応で生成する H_2O_2 を HRP-Orange II 反応系の酸化剤として供給する方法²¹⁾ を検討した。pH が増大するに伴い退色速度定数は増大し、pH 8.5 から 9.0 の範囲で最大となった。退色反応の最適条件では Orange II の移染防止に必要な退色速度 ($k = 2.0 \text{ min}^{-1}$)²²⁾ が得られた。

POD に対して異なる反応速度を有する色素を共存した場合、反応液中の色素を分析した結果、Fig. 11 に示すように、先に水素供与体として作用した色素の反応中

Fig. 9 Decomposition scheme of Orange II in the presence of organic peracid.

Fig. 10 Effect of activator on decolorization rate constant of Acid Blue 113 and Direct Blue 71.

Fig. 11 Degradation reaction scheme of three mixing dyes on HRP system.

間体の色素のラジカルが水素供与体になりにくい色素（難分解性色素）に作用して、難分解性色素は単独で POD と反応するよりも、反応速度が増大することがわかった²³⁾。

実用上、洗剤中の酸化漂白剤と共存することが考えられる。酸化漂白剤は、比較的穏やかな反応のため、反応の活性化のために漂白活性化剤を使用している場合が多い。RPO に漂白活性化剤を共存させると、反応速度が増大することがわかった²⁴⁾。その機構を、Fig. 9 の左の枠部分に示す。漂白活性化剤 NOBS は H_2O_2 による分解によって有機過酸、及び *p*-フェノールスルホン酸ナト

リウムを生成する。生成された *p*-フェノールスルホン酸ナトリウムが RPO 系の活性化剤として作用し、RPO の中間体である Compound I、Compound II と反応して *p*-フェノールスルホン酸ナトリウムのラジカルとなり、そのラジカルが Orange II とラジカル反応することで、Orange II のラジカルはオレンジ II と RPO が直接酸化還元反応する場合よりも速く形成されることがわかった。

4 おわりに

近年では、家庭洗濯に新型の液体洗剤が使用されるようになり、家庭洗濯で使用される洗剤は多岐にわたっている。しかし、漂白剤の開発は今一歩遅れている感がある。家庭洗濯用洗剤の液性は弱酸性から弱アルカリ性までであり、特に液体洗剤で中性の普及が著しい。従来型の漂白剤はアルカリ性での使用である。今回紹介した POD は、基質特異性が低くばかりでなく、活性化剤を適宜選択することで、広い pH で安定的に使用できる可能性がある。さらに、環境負荷を考慮した新しいタイプのドライクリーニングの検討が進むと予想されるが、有機溶媒耐性もある POD を使用する可能性もひろがるのではないだろうか。

文 献

- 1) T. Tamura, T. Kubozono, M. Tamura & H. Yoshimura, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **44**, 1086 (1995).
- 2) T. Tamura, T. Kubozono, M. Tamura & H. Yoshimura, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **44**, 1093 (1995).
- 3) Y. Imabayashi & S. Yoshikawa, *J. Jpn. Res. Assn. Textile End-Uses.*, **25**, 400 (1992).

- 4) H. B. Dunford, *Adv. Inorg. Biochem.*, **4**, 41 (1982).
- 5) K. Yokota & I. Yamazaki, *Biochem.*, **16**, 1913 (1982).
- 6) B. B. Kimm, V. V. Pisarev & A. M. Egorov, *Anal. Biochem.*, **199**, 1 (1991).
- 7) M. Morita, R. Ito, T. Kamidate & H. Watanabe, *Text. Res. J.* **66**, 470 (1996).
- 8) 上館民夫, 柴田剛典, 渡辺寛人, 森田みゆき, 日本油化学会誌, **48**, 497 (1999).
- 9) M. Morita, K. Takada, M. Morisaki & E. Komatsu, *Sen'i Gakkaishi*, **64**, 125 (2008).
- 10) M. B. Arnao, M. Acosta, J. A. del Rio & F. García-Cánovas, *Biochimica Biophysica Acta*, **1038**, 85 (1990).
- 11) 松林真奈美, 松林誠, 森田みゆき, 繊維学会誌, **71**, 250 (2015).
- 12) T. Kawano, S. Muto, M. Adachi, H. Hosoya & F. Lapeyrie, *Bios. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 646 (2002).
- 13) S. Bagger & R. J. P. Williams, *Acta Chem. Scand.* **25**, 976 (1971).
- 14) S. A. Adediran, *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 279 (1996).
- 15) M. Morisaki, M. Morita & K. Ito, *J. Oleo Sci.*, **54**, 573 (2005).
- 16) 森田みゆき, 山口江利子, 小松恵美子, 伊藤理恵, 上館民夫, 渡辺寛人, 日本油化学会誌, **48**, 793 (1999).
- 17) F. G. Sanchez, A. N. Diaz & J. A. G. Gracia, *Anal. Chim. Acta.*, **310**, 399 (1995).
- 18) M. Morita, T. Kamidate, T. Shibata & H. Watanabe, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46**, 807 (1997).
- 19) 上館民夫, 柴田剛典, 渡辺寛人, 森田みゆき, 日本油化学会誌, **47**, 1345 (1998).
- 20) 東輝, 森田みゆき, 繊維学会誌, **70**, 100 (2014).
- 21) 森田みゆき, 小松恵美子, 上館民夫, 渡辺寛人, 日本油化学会誌, **46**, 999 (1997).
- 22) 森田みゆき, 小松恵美子, 上館民夫, 渡辺寛人, 繊維学会誌, **53**, 289 (1997).
- 23) 森田みゆき, 高田貴代美, 森崎真奈美, 小松恵美子, 繊維学会誌, **64**, 125 (2008).
- 24) 森田みゆき, 渡辺貴子, 東輝, 繊維学会誌, **69**, 147 (2013).