

ペルオキシダーゼによる2,4,6-トリクロロフェノールの環境からの除去

藤本尚利*, 室原千賀子*, 白坂憲章*, 村上哲男*, 五影 勲*, 吉栖 肇**

Elimination of an Antifungal Agent, 2,4,6-trichlorophenol, from the Environment
by PeroxidasesNaotoshi FUJIMOTO, Chikako MUROHARA, Norifumi SHIRASAKA, Tetsuo MURAKAMI,
Isao ITSUKAGE and Hajime YOSHIKUNI

Synopsis

Antifungal compound, 2,4,6-trichlorophenol (TCP) has been frequently used as a component of the wood antiseptics, hence is widely distributed to environment. It was shown that the some part of TCP was methylated at hydroxyl residue and was converted into 2,4,6-trichloroanisole (TCA) by the various microbes. Since TCA has very strong musty odor at low concentration (ppb-ppt level) in aqueous solution, its diffusion into foods and other goods through plastic packing materials results in the deterioration of these goods with musty contamination. To prevent the formation of TCA, TCP should be removed from the environment.

In the proceeding paper, it was shown that the elimination of TCP is achieved by the use of peroxidases (EC 1.11.1.7) derived from *Arthromyces ramosus* and horse raddish.

I 緒 論

ハロゲン置換フェノール, 特に2,4,6-トリクロロフェノール (TCP) は製紙工業におけるバルブ等に存在し¹⁾, その一部は種々の微生物によって2,4,6-トリクロロアニソール (TCA) に変換されることが知られている²⁾. このTCAは極低濃度 (ppq-pptレベル) で強い黴臭を示し, 食品等に異臭をつけることが明らかにされた³⁾. 最近, このTCAが合成樹脂製の包装資材を通過して食品に黴臭をつけるメカニズムが報告された⁴⁾. TCAは商品包装に使用されるファイバーボードカートン中に残存していたTCPの水酸基が汚染繁殖した微生物によってo-メチル化されて生成し, 包装袋やキャップを通して食品に溶解し黴臭汚染を起こすことが判明した⁵⁾. この

TCA黴臭汚染を完全に防止するためには包装関連資材からTCPを除去することが望ましい。本報告ではペルオキシダーゼ (EC1.11.1.7) を用いたTCPの除去法について検討した結果について述べる。

II 実験材料ならびに方法

1 ペルオキシダーゼ (POD)

実験に用いた POD (EC1.11.1.7) としては *Arthromyces ramosus* (真菌) 起源のもの⁶⁾ と西洋わさび (アブラナ科) 起源 (和光純薬) の2種類を用いた。両酵素の比活性は100 units/mg (4-アミノアンチピリン/フェノール発色系)⁷⁾ になるように調節して用いた。

2 トリクロロフェノール (TCP) の定量法

* 近畿大学農学部食品栄養学科 (Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi, Nara-city 631, Japan)

** 近畿大学農学総合研究所 (兼務)

TCPはHPLCによって測定したが、測定条件は以下のごとく設定した。HPLC: Shimazu LC-5A, TOYO SODA UV-8000, Column: COSMOSIL ODS 5C18 (4.6×150 mm) Nakarai Tesuque, Mobile phase: 25 mM KH_2PO_4 (PH7.0)- CH_3HN (3:6), Flow rate: 1.0 ml/min, Wave length: UV 254 nm.

3 PODによるTCP除去実験

1/10 M phosphate buffer (pH 7.0) に被検 TCP を添加し、POD 反応前後の TCP を定量して POD による TCP 除去を検討した。

4 定能テストによる POD の TCP 除去効果の確認

TCP もフェノール系の薬品臭を認めるので、官能テストによって POD の TCP 除去効果を検討した。この実験には *Arthromyces* POD を用い、TCP 量 (A 因子, ppm) を $A_1=0, A_2=20, A_3=40, A_4=60$ の 4 水準とした。POD 添加量 (B 因子, units/4 ml 反応液を), $B_1=0, B_2=5, B_3=10, B_4=30, B_5=50$ の 5 水準とした。官能テストのパネリストは研究室専攻生 20 名の中からランダムに選び (C 因子) とし、 $C_1=S$ 君, $C_2=F$ 君, $C_3=Y$ 君, $C_4=YK$ 君の 4 水準とした。また、測定日は $D_1=12$ 月 8 日と $D_2=12$ 月 9 日の 2 水準とした。なお、A と B は母数因子で、C と D は変数因子とした。全量が 4 ml の反応液に各水準の TCP と POD を添加し 5 分間室温で攪拌したのち官能テストを行った。官能テストの特性値は

1) 臭いはない: 0, 2) 臭いがあるとも言えない: 1, 3) 臭いがある: 2, 4) 大変強い臭いがある: 3, として証価した。1日に延測定回数80回のうち AiBj (20組合せ) については順序はランダムに、2日で総測定数160回を得た。なお、1人のパネリストの測定は15分間隔で行い、残存効果・疲労効果を少なくした。

III 実験結果

1 *Arthromyces* POD と西洋ワサビ POD による TCP の除去

燐酸緩衝液 (100 mM, pH 7.0) に TCP を $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう添加した後、種々の量の POD を添加し、 25°C で 15 min 反応後 HPLC によって TCP を測定した。Fig. 1-(a), (b) に添加 POD による TCP の減少を示した。(a) では *Arthromyces* POD $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で西洋ワサビ POD $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ で TCP はほぼ消滅し、(b) では両 POD とも約 2 units/ml で TCP は除去されることが認められる。従って環境中の TCP は両 POD によって取り除くことができ、TCP から TCA への微生物変換による食品等の微臭汚染の原因物質の除去が可能であることを示した。

2 官能テストによる POD の TCP 除去効果確認

官能テストによるデータを Table 1 に示した。分散分析・重回帰分析を行い、 A_1 の重回帰直線 (1次) 式と A_2, A_3, A_4 を込みにした式を Fig. 2 にまとめた。Fig. 2 の下の線は TCP 濃度 0 ppm の時の評価

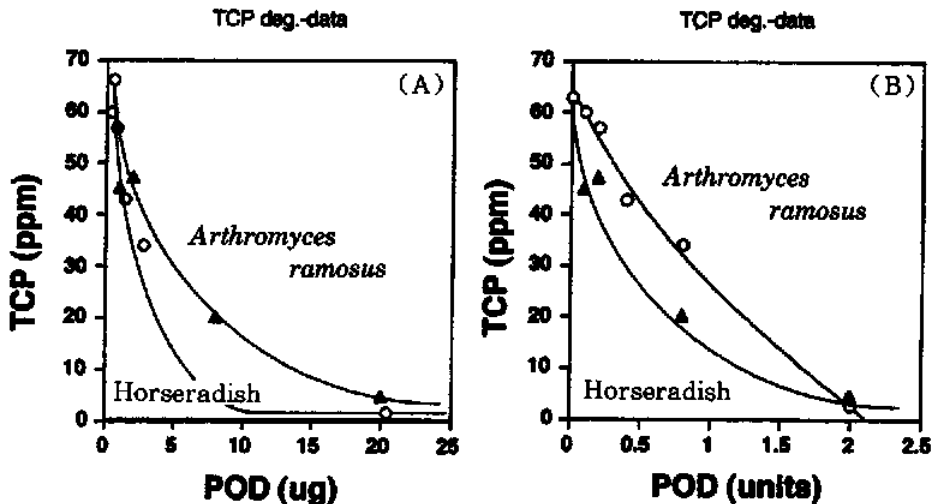


Fig. 1. TCP removal by POD from *Arthromyces ramosus* and horse radish. (A) *Arthromyces ramosus* POD, (B) Horse radish POD

Table 1. Analysis of variance (Yijkl)

N=160

		B ₁ (0)		B ₂ (20)		B ₃ (40)		B ₄ (60)		B ₅ (80)		Total	mean
A ₁ (0)	C ₁	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	
	C ₂	2	1	1	2	3	1	2	2	2	2	18	
	C ₃	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	3	
	C ₄	1	0	1	0	0	0	0	3	0	0	5	
a total		4	1	4	3	3	1	2	6	2	2		28
mean		0.625		0.875		0.500		1.000		0.500			0.700
		B ₁ (0)		B ₂ (20)		B ₃ (40)		B ₄ (60)		B ₅ (80)			mean
A ₂ (20)	C ₁	3	2	1	2	1	2	2	2	2	3	20	
	C ₂	2	3	2	2	3	2	3	3	2	2	24	
	C ₃	3	2	2	2	2	2	3	1	2	1	20	
	C ₄	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1	15	
a total		11	10	7	7	7	7	9	7	7	7		79
mean		2.625		1.750		1.750		2.000		1.750			1.975
		B ₁ (0)		B ₂ (20)		B ₃ (40)		B ₄ (60)		B ₅ (80)			mean
A ₃ (40)	C ₁	2	2	1	2	1	2	2	1	3	2	18	
	C ₂	3	2	1	1	0	1	0	2	3	2	15	
	C ₃	1	2	2	2	2	2	2	0	2	2	17	
	C ₄	2	2	2	2	0	3	3	1	2	2	19	
a total		8	8	6	7	3	8	7	4	10	8		69
mean		2.000		1.625		1.375		2.250		1.725			
		B ₁ (0)		B ₂ (20)		B ₃ (40)		B ₄ (60)		B ₅ (80)			mean
A ₄ (60)	C ₁	3	2	3	2	2	2	3	1	2	2	22	
	C ₂	2	3	2	1	2	1	1	2	3	3	20	
	C ₃	2	2	2	2	2	2	1	2	2	3	20	
	C ₄	0	3	3	2	1	1	3	2	3	2	20	
a total		7	10	10	7	7	6	8	7	10	10		82
mean		2.125		2.125		1.625		1.875		2.500			2.050
total		30	29	27	24	20	22	26	24	29	27		258
mean		1.844		1.594		1.313		1.563		1.750			1.613

Components of Data

$$Y_{ijkl} = m + a_i + b_j + (ab)_{ij} + (ag)_{jk} + (bg)_{jk} + (bd)_{ji} + (gd)_{ki} + e_{ijkl}$$

$$Sa_i = 0, Sb_j = 0, Sg_k \neq 0, \epsilon(gk) = 0, Sd_l \neq 0, S(d_l) = 0$$

$$Se_{ijkl} \neq 0, \epsilon(e_{ijkl}) = 0, e_{ijkl} \in NID(0, S_e^2)$$

Factors: A₁~A₄=TCP concentration (ppm)

B₁~B₄=POD concentration (units/4 ml)

C₁~C₄=Panelers

値を示したもので、嗅覚評価値が1以下を通り、臭いが有るとも無いとも言えないことを示している。上の曲線は TCP 濃度20, 40, 60 ppm の場合を示し、POD 添加濃度が20 units/4 ml で嗅覚評価値は最低を示している。しかし POD 濃度が20 units/4 ml を

越えると嗅覚評価値は逆に上昇している。したがって、POD は水溶液中の TCP を系外に除去する事は明らかであるが、POD 酵素量が過剰になると生成物が再分解されるか、または別の臭気を有する物質を再生成する可能性が考えられる。しかし、この官能

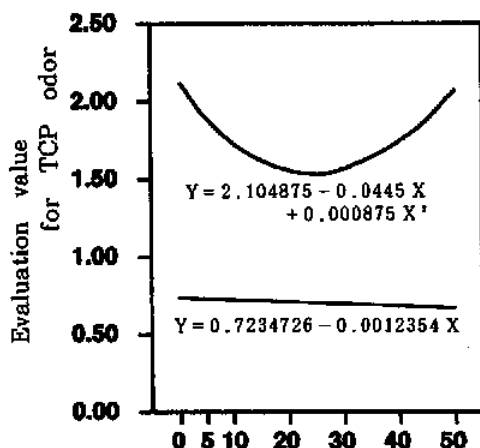


Fig. 2. Organoleptic test for TCP removal by POD.

テストによって、PODを2~4 units/m³添加することによってTCPを除去出来ることが確かめられた。

IV 考 察

TCPはその強い殺菌力の故に、木材等の防腐剤に使用されプロイラー飼育場の床敷きの大網屑に残留し、種々微生物によってTCAに変換されてプロイラーに微臭を付けた事例^{9,10)}が1970年代に報告されている。1980年代にはTCAが包装材を通してココア粉末や乾燥果実等^{11,12)}を汚染し商品価値を著しく低下させることが知られている。極めて低濃度(ppq-ppt level)で微臭を付けるTCAはTCPの微生物変換によって生成するが、このTCPは微量のフェノールを含む都市・工場排水を塩素処理した場合にも生成し¹³⁾、河川に放流された後に用水として再使用される場合にTCPからTCAへの変換が起こり都市上水を汚染する可能性が指摘される。このようにTCP等の塩素化フェノール類が環境に広く分布する現状に鑑み、酵素的なTCP除去技術の構築は環境浄化の面からも有用であり、POD処理によって微臭原因物質TCAの生成防止技術としても重要であると考えられる。

V 要 約

殺菌剤等の形で自然界に散布されて残留したり、フェノール含有排水の塩素処理によって生成したりして自然環境に存在する塩素化フェノールのTCPは微生物変換されて微臭の強力なTCAになり、食品等を汚染する。この微臭汚染を防除する方法として、2種類のPOD酵素を用いるTCP除去法を検討した。*Arthromyces ramosus*と西洋ワサビ由来PODはいずれも2 units/m³程度で80 ppm程度のTCP水溶液からTCPを除去しうることを示した。このPODによるTCP除去作用は官能テストによっても確認された。

引用文献

- 1) L.A. Golovleva, O.E. Zaborina, and A.Y. Arinbassarova: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 815-819(1993).
- 2) A. Allard, M. Remberger, and A.H. Neilson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 839-845(1987).
- 3) D.G. Land, M.G. Gee, J.M. Gee, C.A. Spinks: *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1585-1591(1975).
- 4) 馬場重希, 他: *日本包装学会誌*, **3**, 35-44(1994)
- 5) 但馬良一, 他: *日本包装学会誌*, **3**, 45-55(1994)
- 6) Y. Shinmen, S. Asami, T. Amachi, S. Shimizu, and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 247-249(1986).
- 7) 中山 亮, 天知輝夫: *バイオサイエンスとインダストリー*, **50**, 442-444(1992)
- 8) R.F. Curis et. al.: *J. Sci. Ad. Agric.*, **25**, 811-828(1974)
- 9) J.M. Gee, and J.I. Peel: *J. Gen. Microbiol.*, **85**, 23-243(1974).
- 10) C. Dennis, et. al.: *J. Sci. Fd. Agric.*, **26**, 861-867(1975).
- 11) F.B. Whitefield, et. al.: *Chem. Ind.*, (Lond) 772-774(1984).
- 12) F.B. Whitefield, et. al.: *Chem. Ind.*, (Lond) 661-663(1985).
- 13) 小野寺祐夫, 他: *衛生化学* **23**, 331-339(1977)