

過酸化水素を消費する添加酵素を用いた漆の硬化条件の改善

高分子系チーム 池永 誠, 橘 洋一
京都工芸繊維大学 北島佐紀人

要 旨

漆は植物より採取され、内在の酵素であるラッカーゼの作用によって硬化するため、硬化時に有機溶剤を必要としない極めて環境負荷の低い材料であり、その普及や反応機構に則った材料開発が望まれている。前報にて、塩基性条件にて漆の主成分であるウルシオールから過酸化水素が大量に生成することを確認した。また過酸化水素が、漆ラッカーゼの活性低下、及び漆の硬化時間の遅延を引き起こすことを確認した。本研究では、ウルシオールから生成する過酸化水素が、酵素の一種である西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼを添加することで、反応系中から十分に消費されることを見出し、これにより塩基性条件における漆の硬化を実現した。西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼの役割を検討したところ、過酸化水素の消費によるラッカーゼの活性低下の抑制であり、漆の硬化はラッカーゼによるウルシオールの酸化に起因することが示唆された。

1. 緒言

環境問題への懸念から、環境負荷の低い材料の開発が世界的に望まれている。伝統的な塗料である漆は、植物由来であり、内在酵素のラッカーゼが主成分のウルシオールを酸化することで硬化することから、化石資源由来かつ使用時に有機溶剤を要する一般的な塗料と比べて、環境負荷の低い材料である。そのため我々は漆の普及及びその反応機構に則った材料開発を目指した研究を行っている¹⁻³⁾。

前報にて、漆の主成分であるウルシオールが過酸化水素の生成を伴いながら酸化されること、及びその反応が塩基性下にて促進されることを見出した(図1)⁴⁾。また、過酸化水素が漆ラッカーゼの活性低下、及び漆の硬化時間を遅延することを確認した。これらの結果より、過酸化水素によって漆の硬化条件が制限されている可能性が示唆された。そこで本研究では、塩基性下においてウルシオールから生成する過酸化水素を添加酵素によって消費することにより、漆の硬化特性の改善を目指した。

2. 実験方法

2.1 材料

漆は、佐藤喜代松商店より購入した中国産の生漆を使用した。生漆とは、樹木より採取した漆を濾過のみ行ったものである。ウルシオールは、生漆からジエチルエーテルにより抽出したものを使用した。ウルシオールの分子量は、これまでの報告から316.6とした⁵⁾。その他の試薬は、富士フィルム和光純薬社製のものを使用し、酵素試薬は生化学用の西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP, 酵素番号: 1.11.1.7)及びウシ肝臓由来カタラーゼ(BLC, 酵素番号: 1.11.1.6)を用いた。

2.2 ウルシオールから生成する過酸化水素の測定

ウルシオールをpH 10の炭酸ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液を用いて100 mmol L⁻¹に調整した⁶⁾。そこに、44 mg L⁻¹のHRP, またはBLCを加えた。調整した混合物を室温にて所定時間攪拌後、上澄み液を試料とした。混合物の攪拌中に添加したHRP及びBLCが塩基により失活した場合、ウルシオールから生成する過酸化水素が消費されずに蓄積する。そこで、測定時の試料には別途BLCを加えて、蓄積した過酸化水素から生成する酸素量を酸素電極(YSI社製 5300A)によって測定した。同様の測定を定量した過酸化水素試薬において行い、過酸化水素量とそこから生成する酸素量についての検量線を作成し、各種酵素の存在下におけるウルシオールから生成した過酸化水素の蓄積量を算出した。

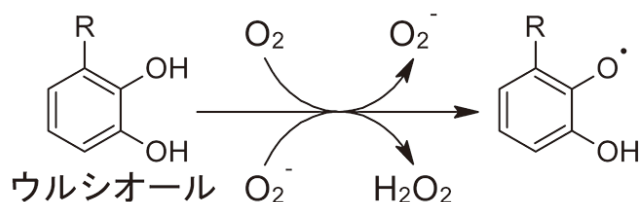


図1 予想されるウルシオールからの過酸化水素の生成反応
R, O₂^{•-}は、それぞれ飽和もしくは不飽和の長鎖炭化水素、スーパーオキシドアニオンを表す。

2.3 酵素試薬を添加した漆の調整

生漆、熱失活漆、もしくはそれらの混合物1.8 gに0.13–0.20 mmolの水酸化ナトリウム、及び2 mgのHRP、BLC、または不活性化したHRPを添加し、漆試料を調整した。熱失活漆は、生漆を80℃で8時間処理し、内在のラッカーゼを完全に失活させ、水分量を生漆と同程度に調整して作成した。不活性化したHRPは、大量の過酸化水素によって失活させた後、メタノールを加えて沈殿化した固体を回収することで作成した。

2.4 硬化時間の測定

調整した漆試料の硬化時間を、塗料乾燥時間測定器（太雄機材社製 Dry Time Tester）により測定した。試料を37.5 µmのフィルムアプリケーターを用いて塗布し、硬化は恒温恒湿槽にて20℃、相対湿度80%の条件にて行った。塗膜の硬化時間は、塗料乾燥時間測定器にて装置の針が塗膜の上部を滑り出した時間とした。また、240時間経過後に硬化しなかった試料を硬化不良とした。

2.5 FT-IR及び¹H NMRによる分析

ウルシオール重合の進行を確認するため、FT-IRスペクトル及び¹H NMRスペクトルを得た。測定サンプルは、調整した漆試料を50 µmのフィルムアプリケーターによってガラス板に塗布し、20℃、相対湿度80%にて様々な時間、静置して作成した。得られた硬化及び未硬化のサンプルをフーリエ変換赤外分光光度計（PerkinElmer社製 Frontier FT-IR）のATR法及び核磁気共鳴装置（Bruker社製 AV600）によって測定した。

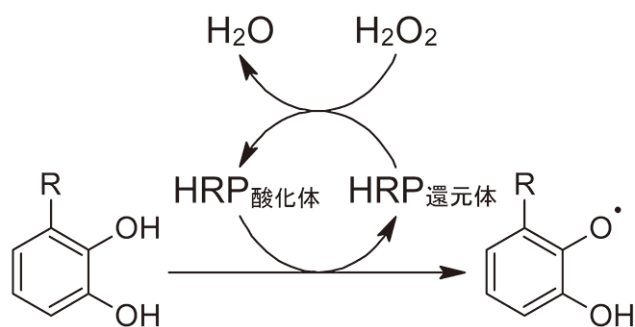


図2 ペルオキシダーゼの過酸化水素分解反応



図3 カタラーゼの過酸化水素分解反応

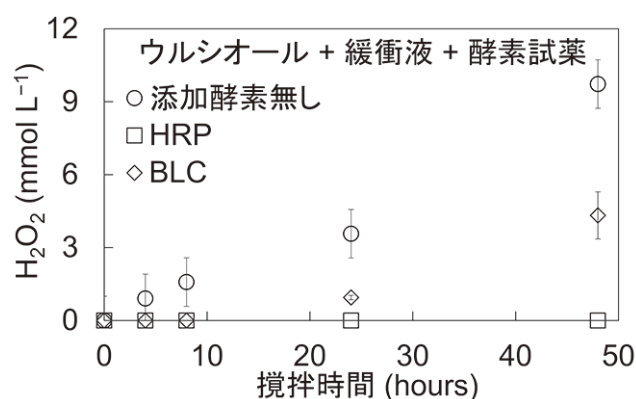


図4 ウルシオールから生成する過酸化水素における添加酵素の効果

NMRの測定は、テトラメチルシランを含有した重クロロホルム溶液にて行った。

3. 実験結果と考察

3.1 ウルシオールから生成する過酸化水素における添加酵素の効果

本実験で使用したHRP、及びBLCは、植物、動物、及び菌類を問わず、幅広い生物に存在する酵素である⁷⁾。HRPは、過酸化水素を水に還元しつつ、フェノール類を酸化する（図2）。つまり、過酸化水素とウルシオールの存在下のHRPは、過酸化水素を分解しつつ、ウルシオールを酸化することが予想される。一方、BLCによる過酸化水素の分解は、水と酸素への不均化反応のみである（図3）。

図4にウルシオールから生成した過酸化水素の蓄積量と攪拌時間の関係を示す。添加酵素のない溶液においては、ウルシオール溶液の攪拌時間に伴って、過酸化水素の量が増加した。一方、HRPを添加した場合では、測定を行った全てのサンプルにおいて、過酸化水素が検出されなかった。これは、図2の反応によって、HRPが生成した過酸化水素を消費しているためと考えられる。一方、BLCを添加した溶液では、8時間の攪拌まではHRPと同様に過酸化水素が検出されなかったが、24時間以上攪拌したサンプルにおいては、過酸化水素の量が増加していた。これは、攪拌8時間以降に塩基性条件によって、BLCの活性が完全に失活したことで過酸化水素を分解できなくなったためと考えられる。

以上の結果より、ウルシオールから過酸化水素が大量に生成する塩基性条件において、過酸化水素の消費に対してHRPが効果的であった。また、BLCもHRPより短

時間ではあるが過酸化水素の消費効果が確認された。

3.2 漆の硬化時間における添加酵素の効果

過酸化水素の生成量が多い塩基性条件の漆において、過酸化水素を消費する酵素（HRP、BLC）を加えた硬化時間を図5に示す。HRPを添加した生漆では、測定した全ての領域において硬化が確認された。一方、添加酵素の無い生漆では0.17 mmol以上の水酸化ナトリウムを添加したところ、硬化不良となった。添加酵素の無い生漆の硬化不良は、ウルシオールから生成した過酸化水素によるラッカーゼの活性低下が原因で起こり、HRPによる過酸化水素の消費によって硬化不良が改善したと推測される。またBLCを添加した生漆では、添加酵素の無いものと同様の結果であり、図4と同様に硬化の途中に塩基性条件にて酵素活性が失活したと考えられる。HRPの添加による漆の硬化が、その酵素活性に依存することを確認するために、不活性化したHRPを用いて、漆の硬化時間を測定したところ、添加酵素の無い生漆と同様の結果となった。

以上の結果より、HRPの添加による塩基性条件の漆の硬化が、HRPの酵素活性に起因することが確認された。

3.3 HRPの役割の検討

3.3.1 硬化時間による検討

HRPを添加した塩基性条件のウルシオールの酸化反

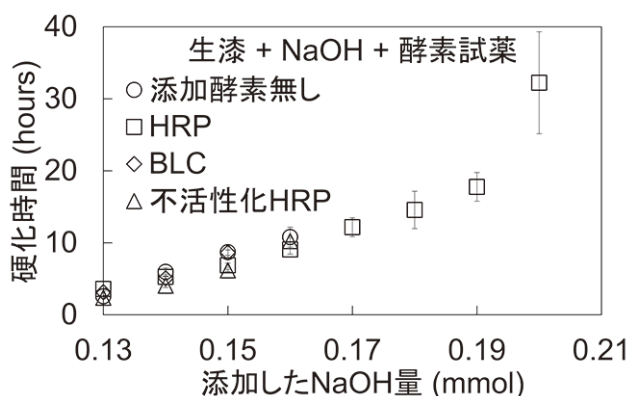


図5 漆の硬化時間における添加酵素の効果
水酸化ナトリウム添加0.17 mmol以上の領域は、HRPを添加したサンプル(□)のみ硬化した

応は、(1) ラッカーゼによる酸化、(2) 過酸化水素の生成反応による酸化（図1）、及び(3) HRPによる過酸化水素を消費しながら行われる酸化（図2）の3種類の反応が想定される。それぞれのウルシオールの酸化が、どの程度漆の硬化に寄与しているか、HRPの役割から検討を行った。まず、HRPの役割がウルシオールの酸化であった場合、漆内在のラッカーゼが失活した状態でも、HRPがラッカーゼの代わりにウルシオールの酸化を行うことで漆の硬化が起こることが予想される。そこで、ラッカーゼを失活させた熱失活漆と生漆を任意の割合に混合したものに、過酸化水素生成のための水酸化ナトリウムとHRPを添加して、硬化時間を測定した結果を表1に示す。熱失活漆のみ（生漆の割合が0%）に水酸化ナトリウムとHRPを加えたサンプルでは、240時間経過後も硬化しなかった。一方、生漆と熱失活漆の混合物（生漆の割合が75%以上）では、硬化が確認された。この結果より、過酸化水素が生成する条件下でHRPを加えた漆の硬化においても(1)の反応を起こす漆内在のラッカーゼの酵素活性が必須であることが示された。したがって、漆の硬化に寄与したウルシオールの酸化はラッカーゼにより行われており、HRPの役割は、過酸化水素の消費によるラッカーゼの活性低下の抑制であることが示唆された。

3.3.2 分光法を用いた検討

FT-IR及び¹H NMRを用いて、HRPの役割を検討した。漆は硬化の過程において、ウルシオール同士で様々な結合が形成される。ウルシオールに新たに形成される結合は、芳香環同士の反応 [図6.(a)]、芳香環と側鎖の反応 [図6.(b)]、及び側鎖同士の反応 [図6.(c)] の3種類に大別される⁹⁾。HRPの有無によるこれらの新たな結合を測定することで、HRPの役割を検討した。測定したサンプル及び結果を表2に示す。

FT-IRスペクトルを図7に示す。生漆の硬化過程のスペクトルでは、これまでの報告と同様にウルシオールの重合が進行する過程において、以下のピークの変化が観測された [図7.(1)]⁹⁾。ベンゼン環の振動である1620及び1595 cm⁻¹の2つのピークが図6.(a)、(b)に示す

表1 水酸化ナトリウム及びHRPを加えた様々な漆の硬化時間

水酸化ナトリウムとHRPを添加した漆の硬化時間を表す。漆は、生漆と熱失活漆を混合して作成した。

漆における生漆の割合 (%)	0	25	50	75	100
硬化時間 (hours)	硬化不良	硬化不良	硬化不良	49.5 ± 2.2	14.6 ± 2.6

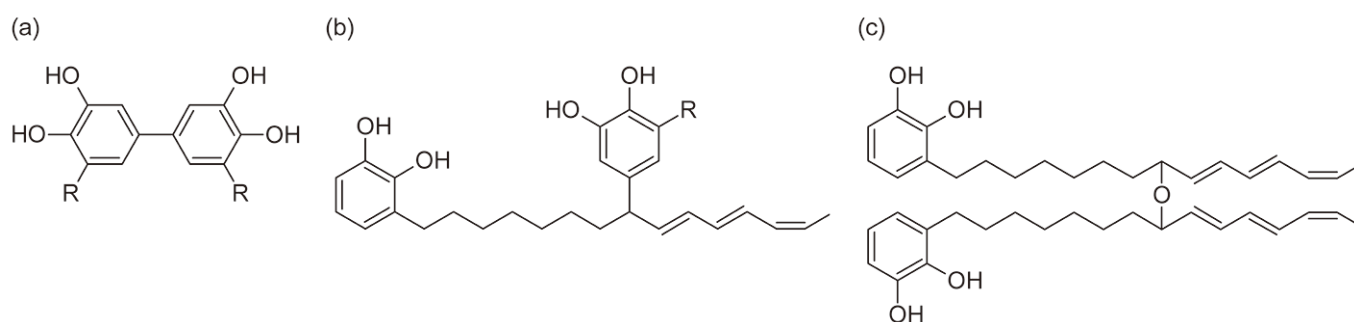


図6 ウルシオール反応により形成する二量体の例

(a)は芳香環同士の反応、(b)は芳香環と側鎖の反応、(c)は側鎖同士の反応。

表2 サンプル組成とFT-IR及び¹H NMRの測定結果

+及び-は、それぞれ添加及び無添加を表す。透過率の割合は、IRスペクトルにおける990 cm⁻¹の透過率を945 cm⁻¹の透過率で割った値を表す。積分値は、NMRスペクトルにおける2.45–2.7 ppmの積分値を2とした時の、6.5–6.9 ppmの積分値を表す。

サンプル名	漆	NaOH	HRP	静置時間	状態	透過率の割合 (FT-IR)	積分値 (¹ H NMR)
A0	生漆	-	-	0 min	未硬化	0.997	2.80
A20	生漆	-	-	20 min	未硬化	0.978	2.33
A40	生漆	-	-	40 min	未硬化	0.965	2.18
A60	生漆	-	-	60 min	未硬化	0.943	2.22
A 硬化	生漆	-	-	80 min <	硬化	0.940	-
B	熱失活漆	+	-	10 day	未硬化	0.981	2.36
C	熱失活漆	+	+	10 day	未硬化	0.979	2.41
D	生漆	+	-	10 day	未硬化	0.984	2.34
E	生漆	+	+	9 h	未硬化	-	2.23
E 硬化	生漆	+	+	12 h <	硬化	0.938	-

新たな結合の形成によってブロード化した。1475 cm⁻¹のピークは、強度が低下し、新たに1460–1430 cm⁻¹にブロードなピークが出現した。このピークの変化は、主にウルシオールの側鎖に結合が形成したためと考えられる。ウルシオールモノマーの側鎖に存在する非共役の二重結合に起因する982及び945 cm⁻¹のピークは、重合により図6. (b), (c)に示す共役二重結合に変化して990 cm⁻¹にシフトした。990 cm⁻¹の透過率を945 cm⁻¹の透過率で割った値を算出したところ、硬化前の約1から、重合の進行に伴い減少し、硬化後は0.940となり(表2)、2つのピークの割合から硬化の進行度が確認できた⁹⁾。水酸化ナトリウムを加えた生漆及び熱失活漆において、硬化の進行にHRPが及ぼす影響を測定した[図7. (2)]。硬化は、HRPを添加した生漆のみ[図7. (2)のE]において起こり、その他は硬化不良であった。熱失活漆の図7. (2)のBとCは、重合がわずかに進んだ図7. (1)のA20と同様のスペクトルであった。この重合の進行は、図1に示す過酸化水素の生成反応に伴うウ

ルシオールの酸化に起因することが予想される。しかしながらHRPの有無によるスペクトルの差がなく、HRPによる重合の進行は確認されなかった。一方、水酸化ナトリウムを加えた生漆である図7. (2)のDとEでは、HRP無しではラッカーゼが失活するため、熱失活漆と同様のスペクトルであったのに対して、HRPを添加した生漆では、図7. (1)の硬化した生漆と同様のスペクトルとなった。990 cm⁻¹と945 cm⁻¹の透過率の比も、硬化しなかった熱失活漆及びHRP無しの生漆では約0.98であったのに対し、HRPを添加して硬化した生漆では0.938まで減少しており(表2)、過酸化水素が生成する条件においては、ラッカーゼの活性とHRPの両方がある図7. (2)のEのみ十分なウルシオールの重合の進行が確認された。

¹H NMRの測定結果を図8に示す。¹H NMRの測定にあたって、芳香環、及び芳香環と結合した炭素であるベンジル位に着目した。芳香環のプロトン数は、ウルシオールが反応し、図6. (a), (b)に示す新たな結合

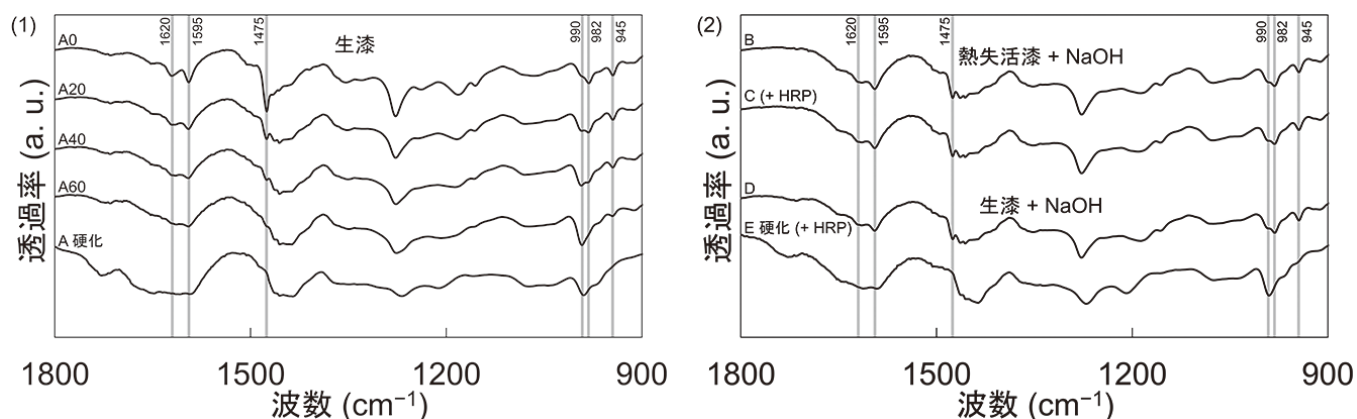


図7 (1)無添加の生漆、及び(2)水酸化ナトリウムを加えた漆のFT-IRスペクトル
測定したサンプル組成は表2に示す。

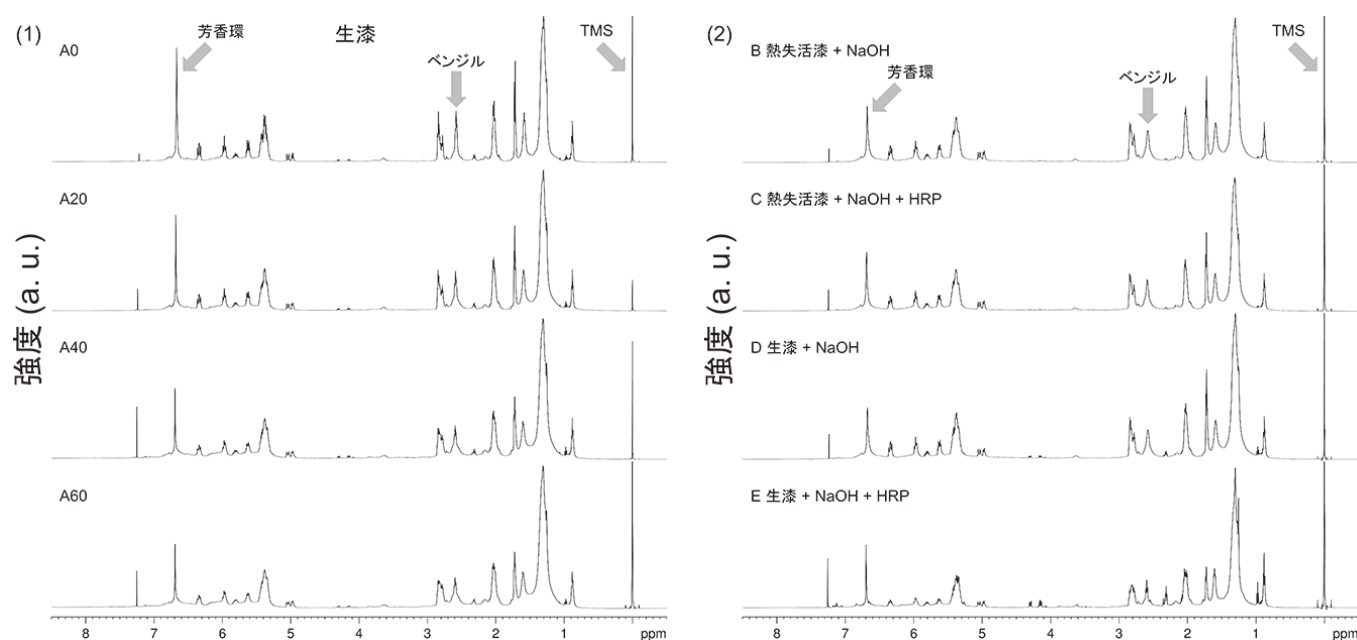


図8 (1)無添加の生漆、及び(2)水酸化ナトリウムを加えた漆のNMRスペクトル
測定したサンプル組成は表2に示す。測定は、テトラメチルシラン(TMS)を含有した重クロロホルム溶液にて行った。

が形成されることで減少する。一方、ウルシオールモノマーのベンジル位は、反応に関与せず新たな結合が形成されないことからプロトン数が増減しない。これらの理由により、ウルシオールモノマーのベンジル位のプロトン (2.45–2.7 ppm) の積分値を理論値である2として、反応によって減少する芳香環のプロトンの積分値 (6.5–6.9 ppm) を算出することで、ウルシオールの重合の進行度が確認できる。図8・(1)に生漆の硬化過程のスペクトルを示す。硬化反応が進行するにしたがって、芳香環のプロトンの積分値が2.80から2.23まで減少しており(表2)、ウルシオールの重合の進行が確認された。図8・(2)に水酸化ナトリウムを加えた生漆及び

熱失活漆におけるHRPの有無によるスペクトルの違いを示す。熱失活漆では芳香環のプロトンの積分値がどちらも約2.4であった(表2)。重合が全く進行していない図8・(1)のA0と比較して、過酸化水素の生成反応によるわずかな重合の進行は確認されるが、HRPの有無による差が観測されなかったことから、HRPによるウルシオールの重合は確認されなかった。一方、HRP無しの生漆である図8・(2)のDでは、芳香環のプロトンの積分値が2.34であったのに対し、HRPを加えた図8・(2)のEにおいて積分値が2.23まで減少しており、硬化直前の無添加の生漆である図8・(1)のA60と同様の値までウルシオールの重合が進行していた。

FT-IR 及び¹H NMR の測定結果より、漆内在のラッカーゼが失活した熱失活漆において HRP の有無によるウルシオール の重合反応の進行の差が確認されなかったことから、HRP によるウルシオール の重合反応への寄与は確認できなかった。一方、ラッカーゼの活性がある生漆では塩基性条件下において HRP の有無による重合反応の差が確認されたことから、HRP がウルシオール から生成される過酸化水素を消費することによって、ラッカーゼの活性低下を抑制しており、ラッカーゼがウルシオール を酸化することで、漆の硬化が起こることが示唆された。

4. 結論

本研究では、ウルシオール から生成する過酸化水素の消費について添加酵素による検討を行った結果、HRP が有効であることを見出した。漆の硬化における HRP の役割は、ウルシオール の酸化ではなく、過酸化水素の消費による漆内在のラッカーゼの活性低下の抑制であることが示唆された。HRP の添加によって、通常の漆が硬化できない過酸化水素が大量に生成する塩基性条件での漆の硬化が実現された。塩基性物質であるスレートやモルタルは、建材として広く使用されており、今後、これらへの漆の用途拡大が期待される。

参考文献

- 1) 大藪泰 他：色材協会誌, 65 (1992).
- 2) 安藤信幸 他：色材協会誌, 79 (2006).
- 3) 橘洋一 他：塗装工学, 52 (2017).
- 4) 池永誠 他：京都市産業技術研究所研究報告, 9 (2019) .
- 5) R. Lu, *et al.* : Polymer Reviews, 53 (2013).
- 6) R. G. Bates and V. E. Bower : Analytical Chemistry, 28 (1956).
- 7) H. B. Dunford and J. S. Stillman : Coordination Chemistry Reviews, 19 (1976).
- 8) Sayoko Harigaya, *et al.* : Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (2007).
- 9) 見城敏子：色材協会誌, 46 (1973).
- 10) S. Kitajima, *et al.* : Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 81 (2017).