

環境を守る水対策に関する研究

酸化還元酵素を用いた環境汚染物質の除去

山田和典(応用分子化学科), 柏田 歩(応用分子化学科)

1. 緒論

近年, 内分泌かく乱物質による環境汚染が社会的問題となっており, その影響は拡大の傾向にある. その中で, ビスフェノール A(2,2-ビス(ヒドロキシフェニル)プロパン, BPA)はエポキシ樹脂やポリカーボネート樹脂を製造する際の原料として, またはプラスチックの酸化防止剤や安定剤として広く利用されている.

BPA の国内での年間生産量は 2001 年現在で 4.9×10^5 トンに達し, その後も増加傾向にある. 直鎖または分岐状アルキルフェノールに加えて BPA も内分泌かく乱懸念物質にあげられ, BPA との接触によって動植物や人体などの生態系への様々な影響があると言われている [1]. さらに, BPA は日本各地のゴミ廃棄場からの浸出水からも検出されており, その濃度は 1.3 から高いところでは $1.72 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ に及んでいる. また, 食器類からの食料への BPA の移出も重要な問題となっている.

さらに最近になって BPA と構造が類似した様々なビスフェノール誘導体が高性能化や機能改質を目的として特殊エポキシやポリカーボネートを合成する上で利用され始めている. 使用されるビスフェノール誘導体によってフェノール性 OH 基の位置やフェノール基間の化学構造が異なるが, 2つのフェノール基をもつ点で共通している. BPA が内分泌かく乱作用を有することは報告されていることに加えて [2] ビスフェノール誘導体のいくつかは人体の乳ガン細胞株 MFC-7 中で, またマウスの線維芽細胞株 NIH3T3 中でエストロゲン作用を示すことが報告されている [3].

化学的または生物学的方法による BPA の除去や無毒化に関する研究は幅広く行われているが, 一方で対象となる汚染物質の転換を触媒化する酵素の潜在能力に関心を抱いている多くの研究者がいる. 汚染物質の中には従来の方法では十分に処理できないものも多く, 酵素反応の利用はその問題を解決する一方法である. チロシナーゼ, ペルオキシダーゼ, ラッカーゼ

などの酸化還元酵素によるアルキルフェノール, クロロフェノール, BPA などの転化や無毒化に関する研究も広く行われており, その中で種々のフェノール化合物のペルオキシダーゼによる処理に関する研究においては, (1)酵素反応によるラジカル形成とカップリング反応の反応機構の解明, (2)ポリエチレングリコール (PEG) や界面活性剤などの添加物によるペルオキシダーゼ活性の保護, (3)過酸化水素 (H_2O_2), pH, 温度, 酵素濃度などの至適条件の決定, などに焦点を当てて進められている [4-7]. しかしながら, 酵素を用いたビスフェノール誘導体の処理に関する報告はほとんどないが, ペルオキシダーゼが BPA を処理できることに着目し, その応用性を試みた. 本研究では, H_2O_2 濃度, PEG の分子量と濃度, pH, 温度, 酵素濃度などがペルオキシダーゼによる BPA の処理に及ぼす効果を検討し, さらに BPA の処理において決定した至適条件をビスフェノール誘導体の処理に応用した.

2. 実験

2.1 試薬

本研究で使用したペルオキシダーゼは西洋ワサビ由来のもの (HRP) (EC 1.11.1.7) であり (type II, essentially salt-free, lyophilized powder), その比活性は $224\text{U}/\text{mg}$ であった.

BPA とビスフェノール誘導体は和光純薬または東京化成工業から購入し, 種々の分子量の PEG はアルドリッチ社製または関東化学工業のものを使用した.

2.2 BPA とビスフェノール誘導体の酵素処理

pH 4 ~ 10 のリン酸緩衝溶液 (イオン強度 0.01M) を用いて $2.0\text{U}/\text{cm}^3$ の HRP 溶液, 0.4mM の BPA 溶液, 0.6mM の H_2O_2 溶液, $2.0\text{mg}/\text{cm}^3$ の PEG 溶液を調製した. 30cm^3 の BPA 溶液に PEG と HRP を加え, 溶液を所定温度まで加温した後, H_2O_2 溶液を加えることによって酵素反応を開始させた. 反応溶液は, 酵素反応中毎

分 1.5×10^3 回転で攪拌し、所定時間ごとに波長 600nm での吸光度から濁度を算出した。さらに、HRP による BPA の処理において決定した至適条件を利用して種々のビスフェノール誘導体の処理を行った。

2.3 BPA とビスフェノール誘導体の定量

BPA とビスフェノール誘導体の濃度は UV 分光計を取り付けた日立 L-7000 HPLC システムを用いて決定した。逆相カラムとして Inertsil ODS-3 (5 μm , 4.6 mm i.d. \times 15 cm) を使い、移動相であるアセトニトリル水溶液の組成と UV 分光計の波長は使用したビスフェノール誘導体の種類によって調整した。移動相の流速は 1.0 cm^3/min であり、試料溶液 20 mm^3 を HPLC に注入し、UV スペクトルを測定した [8]。

3. 結果および考察

3.1 酵素反応の至適条件の決定

3.1.1 H_2O_2 の添加の効果

HRP は H_2O_2 の不在下では酵素活性を示さなかったが、 H_2O_2 を加えると、BPA の濃度は反応時間に対して減少し、 H_2O_2 濃度 0.3mM では反応時間 120 分で BPA は完全に処理された。また、反応開始後約 15 分で最大値に達した濁度は水に不溶なオリゴマーの形成によってその後徐々に低下した。図 1 に pH 6.0, 30°C, 10K-PEG (0.10 mg/cm^3) 存在下での HRP の酵素反応による BPA の処理における H_2O_2 の効果を示す。 H_2O_2 濃度 0.2~0.5mM の範囲で HRP を含む BPA 溶液に H_2O_2 を加えると、BPA の残留率は急激に低下し、 H_2O_2 濃度 0.3mM ($[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{BPA}]=1.0$) では H_2O_2 添加後 30 分でほとんどの BPA が処理

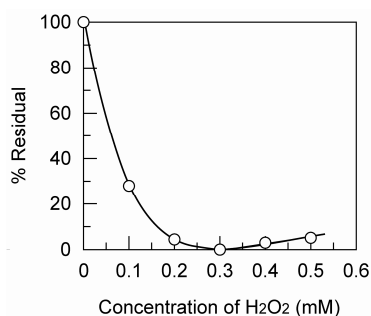


Fig. 1 The effect of the concentration of H_2O_2 on treatment of BPA at 0.3 mM by HRP at 0.10 U/cm^3 in the presence of 10K-PEG (0.10 mg/cm^3) at pH 6.0 and 30°C.

された。この際、HRP の活性部位から放出したフェノキシラジカルはカップリング反応によって 2 量化し、再び酵素反応によってラジカル化される。酵素反応によるラジカル化とカップリング反応は生成したオリゴマーが水に不溶となって沈殿するまで続くが、 H_2O_2 濃度が 0.3mM を越えると、BPA の残留濃度が徐々に上昇し、0.5mM では約 3% の BPA が溶液中に残留した。これらの結果から、0.3mM の BPA を処理する際の至適 H_2O_2 濃度を 0.3mM ($[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{BPA}]=1.0$) と決定した。

3.1.2 PEG の添加の効果

0.3mM の H_2O_2 存在下での HRP による BPA の処理における PEG の濃度と分子量の影響を検討した。図 2 a と b にそれぞれ BPA の処理における分子量 1 万の PEG(10K-PEG) の濃度と PEG の分子量 (PEG 濃度 = 0.10 mg/cm^3) の効果を示す。反応溶液中に PEG を加えないと、BPA の残留率は 75% と高かったが、10K-PEG 濃度が増加するにつれて残留率は低下し、0.10 mg/cm^3 以上で BPA は完全に処理された。この際、濁度は反応開始後 10~15 分で最大となり、その後オリゴマー同士の凝集にともなって

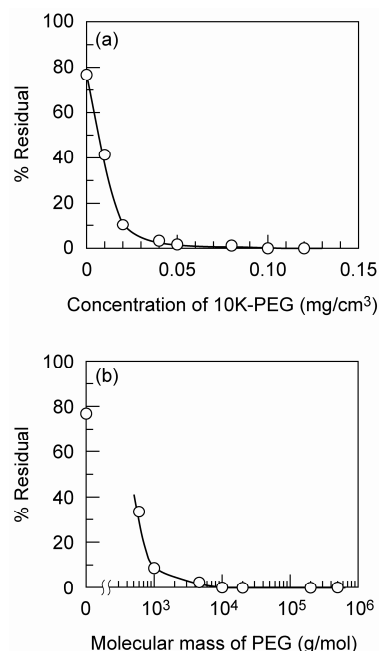


Fig. 2 The effects of the (a) concentration of 10K-PEG and (b) molar mass of PEG (PEG concentration = 0.10 mg/cm^3) on treatment of BPA at 0.3 mM by HRP at 0.10 U/cm^3 in the presence of H_2O_2 (0.3 mM) at pH 6.0 and 30°C.

徐々に低下した。これらの結果は PEG の添加が HRP の酵素活性の保護だけでなくオリゴマーを凝集しやすくする効果もあることを示す。このような酵素反応を利用した BPA の処理の低下は、形成したオリゴマー沈殿物への HRP の取り込みが主な要因とされているが、Nakamoto や Machida らによれば、PEG がオリゴマーとの水素結合による相互作用を引き起こす可能性を示唆している[9]。

次に、BPA が処理処理における PEG の分子量の効果(PEG 濃度=0.1 mg/cm³)を検討した。残留率は加えた PEG を添加の分子量の増加とともに低下し、分子量 1 万以上の PEG を加えると BPA は HRP によって完全に処理された。このように PEG の添加は BPA を処理する際に必要とする酵素量を著しく減少することができるので、処理コストの低減という点からも有効な手段であることがわかった[10]。しかし、分子量が大きくなると、緩衝溶液へ溶解させる時間が長くなるだけでなく PEG 溶液の粘性が高くなり取り扱いにくくなることも考慮に入れると、分子量 1 万の PEG を濃度 0.10 mg/cm³で用いることを至適条件とした。

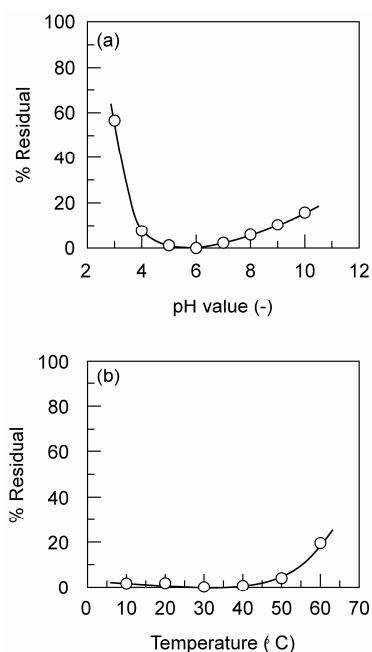


Fig. 3 The effects of the (a) pH value at 30°C and (b) temperature at pH 6.0 on treatment of BPA at 0.3 mM by HRP at 0.10 U/cm³ in the presence of H₂O₂ (0.3 mM) and 10K-PEG (0.10 mg/cm³).

3.1.3 pH と温度の効果

H₂O₂ (0.3 mM)と 10 K-PEG (0.10 mg/cm³)の存在下での BPA の処理における pH と温度の効果を検討した。図 3 に BPA の処理における pH と温度の効果を示す。HRP は pH 4～8 の範囲で BPA が処理のラジカル化を効果的に触媒化し、その至適 pH は 6.0 となった。溶液の pH が pH6.0 から大きく離れると、BPA の残留濃度が徐々に増加したが、pH が低い方が濁度の上昇が大きく不溶性オリゴマーがより凝集しやすいことがわかった。

次に、pH6.0 において H₂O₂ と 10 K-PEG の存在下で BPA 処理における温度の影響を検討した。使用した HRP は 50 °C 以下では BPA に対して高い活性を示し、10 °C での残留率も 1.7% と非常に低い値であり、30 °C では HRP によって完全に処理された。しかし、温度が 50 °C 以上になると、残留率は徐々に上昇したので、上記の結果と合わせて判断すると、至適条件を pH6.0, 30 °C と決定するに至った。

3.1.5. 酵素による処理後の pH 調整

0.3mM の BPA を上記で決定した至適条件で酵素処理すると、不溶性オリゴマーの形成により溶液は白濁した。不溶性オリゴマーは市販の DISMIC[®] membrane filter (pore size: 0.45 μm, Advantec)では除去できるが、粒子が小さいため、ろ紙では十分にろ過することができなかった。しかし、酵素反応処理後、溶液の pH を塩酸で 4.0 に低下させると、オリゴマー同士が凝集するので、ろ紙によって容易にろ過することができた[11]。BPA は pKa 値が 9.6～11.3 である弱酸性化合物であり、pH の低下はフェノール基間のイオン反発を抑制できる。

3.2. ビスフェノール誘導体の除去.

本方法の有効性を高めることを目的として BPA が処理と構造が類似した種々のビスフェノール誘導体の HRP による処理を行った。

ビスフェノール E とビスフェノール T は BPA において決定した至適 HRP 濃度である 0.10 U/cm³で完全に処理された。ビスフェノール B, ビスフェノール C 及びビスフェノール O は BPA を処理する時と比べて比較的低濃度で処理することができたが、ビスフェノール F に対する HRP の活性は BPA に比べてやや低い値となっ

た。また、ジフェノール酸、4,4'-ジヒドロキシベンゾフェノン、2,4'-ジヒドロキシベンゾフェノンなどは $0.5\sim 1.5\text{U}/\text{cm}^3$ で完全な処理が達成できた。しかし、ビスフェノール S(BPS)と2,4'-ジヒドロキシジフェニルスルホン(2,4'-DHDPS)では酵素濃度を $10\text{U}/\text{cm}^3$ まで上げたにも関わらず残留率はそれぞれ48.7%と28.7%にとどまったので、BPSと2,4'-DHDPSの酵素処理を種々のpHで行った。2,4'-DHDPSの残留率はpHの低下によって効果的に高められ、pH5.0で10.8%まで低下した。一方、BPSにおいてはpHを調整したことによる顕著な残留率の低下は見られなかった。この結果から、BPSを酵素反応によって処理するには、由来の異なるペルオキシダーゼを用いるかチロシナーゼやラッカーゼなどの他の酸化還元酵素を用いるなどの方法をとる必要があると考えられる。

これらのビスフェノール誘導体においても酵素反応処理後溶液のpHを4.0まで低下させると、形成した不溶性オリゴマーが凝集して沈下するため、ろ紙によって容易に除去できた。

4. 結論

本研究では、ビスフェノール誘導体の酵素反応による除去と水質浄化を目的としてBPAをモデル化合物として用いてHRPの活性を評価した。0.3mMのBPAを処理する際の至適条件は、pH6.0、30°Cで H_2O_2 濃度を0.3mM、10K-PEG濃度 $0.1\text{mg}/\text{cm}^3$ と決定でき、PEGの添加が酵素活性の保護と処理効率の向上の上で、非常に有用であることがわかった。また、BPAが処理と構造が類似し、同様に2つのフェノール基を有する11種類のビスフェノール誘導体をBPAが処理において決定した至適条件で効果的に処理することができたが、除去率が低い対象物質においては、必要に応じて酵素濃度を上げる必要があった。酵素反応処理によって不溶性のオリゴマーが形成するため、反応溶液は高く白濁したが、酵素反応処理後溶液のpHを4.0まで低下させると、オリゴマー同士が凝集するので、ろ紙によって容易にろ過できるようになり、無色透明な溶液が得られた。

本研究で得られた知見のうち、特記すべきことは、HRPによって多くのビスフェノール誘導体を処理でき、不溶性オリゴマーの形成によって溶液から除去できることである。

5. 参考文献

- [1] S. Kitamura, T. Suzuki, S. Sanoh, R. Kohta, N. Jinno, K. Sugihara, S. Yoshihara, N. Fujimoto, H. Watanabe, S. Ohta, *Toxicol. Sci.*, **84** (2005) 249-259.
- [2] A. V. Krishnan, P. Stathis, S. F. Permeth, L. Tokes, D. Feidman, *Endocrinology*, **132** (1993) 2279-2286.
- [3] S. Kitamura, T. Suzuki, S. Sanoh, R. Kohta, N. Jinno, K. Sugihara, S. Yoshihara, N. Fujimoto, H. Watanabe, S. Ohta, *Toxicol. Sci.*, **84** (2005) 249-259.
- [4] E. Y. Kim, H. J. Chae, K. H. Chu, *J. Environ. Sci.*, **19** (2007) 1032-1036.
- [5] C. Kinsley, J. A. Nicell, *Biores. Technol.*, **73** (2000) 139-146.
- [6] A. Sakurai, S. Toyoda, M. Masuda, M. Sakakibara, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **37** (2004) 137-142.
- [7] M. Wagner, J. A. Nicell, *Water Res.*, **36** (2002) 4041-4052.
- [8] K. Yamada, T. Shibuya, M. Noda, N. Uchiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71** (2007) 2503-2510.
- [9] S. Nakamoto, N. Machida, *Water Res.*, **26** (1992) 49-54.
- [10] I. D. Buchanan, J. A. Nicell, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **72** (1998) 23-32.
- [11] M. Tonegawa, J. Dec, J.M. Bollag, *J. Environ. Qual.*, **32** (2003) 1222-1227.