

ペルオキシダーゼによるビスフェノール A の除去における至適条件の決定

日大生産工(院) ○池田 尚也
日大生産工 柏田 歩・松田 清美・平田 光男・山田 和典

【緒論】

工業的に大量の有機化合物を使用することによって環境に大きな負荷を与え、その1つとして水質汚染がある。水質汚染の中で問題となっているものに内分泌かく乱物質による生態系への影響が挙げられる。内分泌かく乱物質は、生殖や発生、生体内の様々なホルモン合成や分泌、排出を妨げる外因性の化学物質であり、ダイオキシン類やアルキルフェノール類、ビスフェノール類など140種類以上の物質がある¹⁾。

ビスフェノールAの生態への影響として、弱い女性ホルモン作用や乳ガン細胞の増殖及び魚類のメス化などが挙げられる。現在、活性汚泥法、オゾン酸化法、活性炭吸着法などの除去法が見いだされているが、いずれもコスト高や設備の大型化といった問題があるので、我々は低コストで簡易的な方法として酵素反応の利用に着目した。フェノール化合物はペルオキシダーゼの酵素反応によってフェノキシラジカルとなり、生成したフェノキシラジカルの非酵素的なカップリング反応によって水不溶性のオリゴマーを形成するため、ろ過による除去が可能となる²⁾。本研究では、過酸化水素存在下での西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼによるビスフェノール A の除去における至適条件を決定し、ビスフェノール誘導体の除去へ本方法を応用することを目的とする。

【実験】

ペルオキシダーゼは、Sigma Aldrich 製, from horseradish, highly stabilized, 比活性:246U/mg を用いた。pH6.0 のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いてビスフェノール A(5.0mM)、ペルオキシダーゼ(2.0U/cm³)、過酸化水素(20mM)およびポリエチレングリコール(以下 PEG, Mw=1.0×10⁴g/mol, 1.0mg/cm³)溶液を調製した。また、ビスフェノール A は水に対して難溶性であるため、緩衝溶液

にエタノール(反応系中で 30vol%)を加えて溶解させた。ビスフェノール A, ペルオキシダーゼおよび PEG を表 1 に示す濃度になるように混合し、30℃で恒温にした後、H₂O₂ 溶液を加えることによって酵素反応を開始させた。

Table 1 Concentration of each component in a reaction solution.

Component	Concentration
Bisphenol A	2.5 mM
Peroxidase	1.0 U/cm ³
PEG (Mw=1.0×10 ⁴)	0.1 mg/cm ³
H ₂ O ₂	2.5 mM

<濁度の測定>

所定時間ごとに反応溶液を採取し、波長 600nm での吸光度から、(1)式により濁度を算出した。測定後、溶液は直ちに反応系中に戻した。

$$\tau = -\ln \frac{10^{-\text{Abs}}}{l} \quad (1)$$

τ : Turbidity (cm⁻¹), Abs: Absorbance (-)

l : Cell length (cm)

<残留濃度の定量>

所定時間ごとに反応溶液から採取した溶液 0.4cm³ に濃度 100U/cm³ のカタラーゼ緩衝溶液 1.0cm³ を加えてペルオキシダーゼの活性を停止させた後、ウルトラフィルターユニット (Advantec (株)製, 分画分子量 1.0×10⁴)でろ過することにより、生成したオリゴマーと酵素を除去した。さらに、ろ過後の溶液 0.8cm³ に 0.25M の炭酸水素ナトリウム溶液 3.0cm³, 20.8mM のアミノアンチピリン溶液 0.1cm³ および 83.4mM のフェリシアン化カリウム溶液 0.1cm³ を加えて発色させた後、505nm での吸光度を測定し、初期濃度との関係から残留率を求めた。

Determination of Optimum Conditions for Removal of Bisphenol A with Peroxidase.

Naoya IKEDA, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA,
Mitsuo HIRATA and Kazunori YAMADA

【結果および考察】

過酸化水素存在下においてペルオキシダーゼはビスフェノール A をラジカル化する触媒作用を有するので、ビスフェノール A (2.5mM) の除去率に及ぼす過酸化水素濃度の影響を検討した。H₂O₂ 濃度に対する反応時間 180 分での残留率の変化を図 1 に示す。H₂O₂ を添加しないと酵素反応が進行しないので、フェノキシラジカルの生成は起こらないが、過酸化水素濃度が増加するとともに著しく濁度が上昇し、残留率は過酸化水素濃度 2.5mM で最小値を示した。2.5mM 以下では、分解される過酸化水素量が少なく、ペルオキシダーゼの反応サイクル³⁾が十分に進行しないと考えられる。また、高濃度の過酸化水素存在下では、ペルオキシダーゼの反応サイクルまたは形成したフェノキシラジカルのオリゴマー化が遅延されると考えられる。したがって、2.5mM のビスフェノール A をペルオキシダーゼによって処理する際の過酸化水素の至適濃度をビスフェノール A と等モル濃度である 2.5mM と決定した。さらに、ビスフェノール A をペルオキシダーゼによって除去する際の pH、PEG の濃度および分子量、温度、ペルオキシダーゼ濃度などの反応条件を変化させ、濁度と反応後のビスフェノール A の残留濃度を評価した結果、至適条件を pH 6、PEG 濃度 0.1mg/cm³、PEG 分子量 1×10⁴g/mol、温度 30℃、ペルオキシダーゼ濃度 1.0U/cm³ と決定できた。

上記で決定した至適条件において、反応系でのビスフェノール A と過酸化水素の濃度を等しくし低濃度でのビスフェノール A の除去を検討した。表 2 に示すように、ビスフェノール A 濃度を低下させるほど短時間で除去でき、いずれの濃度においても 100% の除去率を得ることができた。

さらに、ビスフェノール A において決定した至適条件において他のビスフェノール誘導体 (2.5mM) の除去を検討した結果を表 3 に示す。ビスフェノール B、E および F では、反応開始とともに濁度が上昇するとともに残留率が低下し、95% 以上の除去率が得られたが、ビスフェノール S は酵素反応を示さなかった。これは使用した酵素の反応特異性によるものであり、別種のペルオキシダーゼを使用するなどの検討が必要である。今後、他のビスフェノール誘導体と低濃度での除去を目指す予定である。

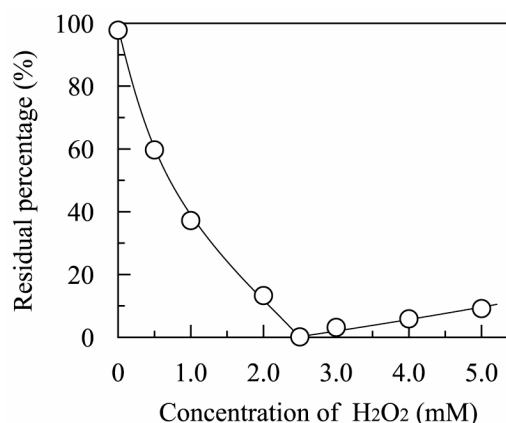


Figure 1 The effect of the concentration of H₂O₂ on removal of bisphenol A (2.5mM) by peroxidase (1.0U/cm³) at 30℃ in an ethanol (30vol%) + pH6.0 buffer mixture in the presence of PEG (Mw = 1.0×10⁴) at 0.1mg/cm³. Reaction time : 180min.

Table 2 Time required for to remove bisphenol A by peroxidase at different concentrations.

[Bisphenol A] (mM)	Ethanol (vol%)	Removal time (min)	Removal (%)
0.1	0	1	100
0.5	10	20	100
1.0	12	30	100
1.5	15	90	100
2.0	20	150	100
2.5	30	150	100

Table 3 Removal of bisphenol compounds under the optimum conditions determined for bisphenol A.

Bisphenol compound	Reaction time (min)	Removal (%)
Bisphenol A	150	100
Bisphenol B	180	94.7
Bisphenol E	90	97.7
Bisphenol F	90	97.1
Bisphenol S	180	0

【参考文献】

- 1) 吉田 隆, 環境ホルモン対策, エヌ・ティー・エス, p133 (1999).
- 2) 北川 優, 吉野健二, 中島 隆, 植松宏彰, 科学と工業, 77, 124 (2003).
- 3) J. A. Nicell, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **60**, 204 (1994).