

マッシュルームチロシナーゼとキトサンを用いたビスフェノール A の除去

日大生産工(院) ○鈴木 瑞穂
日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

様々な用途で用いられている化学物質の中には生体の内分泌作用をかく乱する可能性のある物質も含まれ、その中には哺乳瓶や様々な容器に使用されているポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料であるビスフェノール A(BPA, 2,2-ビス(ヒドロキシフェニル)プロパン)がある。高温下や水蒸気との接触により BPA はポリカーボネートやエポキシ樹脂から分解して環境中へ徐々に溶出し、さらに生体内に取り込まれると癌や生殖異常を引き起こすと考えられている。

現在、工場排水からの BPA の除去方法としてオゾン処理、活性炭による吸着、活性汚泥法などが用いられているが、これらの方法には設備の大型化やコスト高といった問題もある。そのため、小規模で低コストな処理法として酵素反応を利用した方法に注目した。この方法で用いられる酸化還元酵素としてチロシナーゼやペルオキシダーゼがあるが、本研究では酸素存在下でチロシンをジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)に酸化させるクレゾラーゼ活性と DOPA をドーパキノンに酸化させるカテコラーゼ活性の 2 段階の酵素活性をもつチロシナーゼに着目した。チロシナーゼによって種々の *p*-アルキルフェノールをキノン酸化させることができ¹⁾、さらに過酸化水素を添加することで分岐状アルキルフェノールをキノン酸化することができる²⁾。また、酵素反応によって生成したキノンがキトサンと高く反応するため、キトサンビーズへのキノン吸着によってフェノール化合物を効果的に除去できた³⁾。本研究ではマッシュルームチロシナーゼによって BPA をキノン酸化させ、さらにキトサンとの反応性を利用した水溶液中からの除去について検討した。

【実験】

<試料および溶液調製>

チロシナーゼは、Sigma Aldrich 製、from

mushroom, 比活性:2870U/mg を用いた。pH 7.0 のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて BPA(0.4mM)、チロシナーゼ(2000U/cm³)、過酸化水素(6.0mM)溶液を調製した。また、富士紡績(株)からキトサンビーズ(粒径:70~200μm, 比表面積:70~100m²/g)を購入し、緩衝溶液中で保存した。

<酵素活性の測定>

BPA 溶液に過酸化水素とチロシナーゼ溶液を加えることによって酵素反応を開始させた。所定時間ごとに反応溶液の UV-visible スペクトルを測定し、波長 385nm の吸光度の変化をキノン生成の尺度とした。UV-visible スペクトル測定後、試料溶液は直ちに反応溶液に戻した。つぎに過酸化水素濃度、pH、温度などの諸条件を変化させて至適条件を決定し、さらにキトサンビーズを加えて同様な実験を行った。

<HPLC 法による転化率の測定>

反応溶液から採取した溶液 0.5cm³ を 80°C の恒温槽中に数分間浸すことによって酵素を失活させた後、この溶液 20mm³ をマイクロシリンジで採取し、HPLC のカラムへ注入した。GL サイエンス(株)製の InertsilODS-3 カラムを用いて 45%アセトニトリル水溶液を流速 1.0cm³/min で送液し、保持時間 6.9 分に表れるピーク面積より 0.3mM の BPA 溶液でのピーク面積との関係から転化率を求めた。

【結果および考察】

チロシナーゼによる BPA のキノン酸化における至適条件を過酸化水素濃度、pH および温度依存性から評価した。BPA はチロシナーゼの酵素反応によって徐々にキノン酸化されるが、過酸化水素を添加するとキノン生成が上昇するため、キノン酸化における過酸化水素濃度依存性を検討した。pH 7.0、40°C で異なる濃度の過酸化水素を含む 0.3mM の BPA 溶液にマッシュルームチ

Removal of Bisphenol A with Mushroom Tyrosinase and Chitosan

Mizuho SUZUKI, Ayumi KASHIWADA,
Kiyomi MATSUDA, and Kazunori YAMADA

ロシナーゼ(200U/cm³)を加え、酵素反応を開始させた際の反応時間3時間での過酸化水素濃度に対する転化率の変化を図1に示す。0.3mM以下ではキノン転化率は過酸化水素濃度に対して上昇したが、さらに濃度を高くすると上昇傾向が緩やかになった。Jiménezらによれば、これは過酸化水素を加えたことによってmet体チロシナーゼの一部がoxy体へと変わり、oxy体チロシナーゼによってクレゾラーゼ活性の進行が高くなったためと考えられる²⁾。以上の結果から、至適過酸化水素濃度を0.3mMと決定した。さらに、過酸化水素濃度を0.3mMとしてpHと温度依存性を検討した結果、pHを6.0以下にすると、初期速度は大きい短時間で酵素が失活した。これに対して、pH7.0では初期速度はやや低い反応時間に対してキノン形成を示す385nmでの吸光度が上昇した。さらにpHを8.0に上昇させると、初期速度と吸光度が低下したため、以上の結果からpH7.0を至適pHとした。次にpHを7.0として異なる温度でBPAをキノン酸化すると、40℃以下ではキノン形成は上昇するが、50℃以上では酵素の熱変性によって短時間でBPAのキノンへの転化率が一定となったので、至適温度を40℃と決定した。

上記で決定した至適条件においてさらに所定量のキトサンビーズを加えて酵素反応を開始させた際の反応時間に対する波長385nmの吸光度の変化を図2に示す。キトサンビーズを加えると、酵素反応によって生成したキノンがキトサンビーズに吸着することによって吸光度の上昇が大きく抑えられた。また、キトサンビーズ添加量が多いほど吸光度の低下は顕著となり、0.100cm³/cm³において吸光度はほぼゼロまで低下した。さらにキトサンビーズ量を増加させるとより短時間で除去できたが、キノンを吸着する最小のキトサンビーズ量である0.100cm³/cm³を至適量とした。また、キトサンビーズを加えると、形成したキノンの吸着によって溶液中のキノン濃度が低下するため酵素反応が向上し、キノン転化率も上昇した。また、対象実験としてキトサン溶液を添加した均一系で除去実験を行うと、酵素反応によって形成したキノンが溶液中でキトサンと結合して沈殿を形成したが、キトサンビーズを用いると3時間ほどで除去できるのに対してキトサン溶液を用いると24時間を要し、キノンを完全に除去することもできな

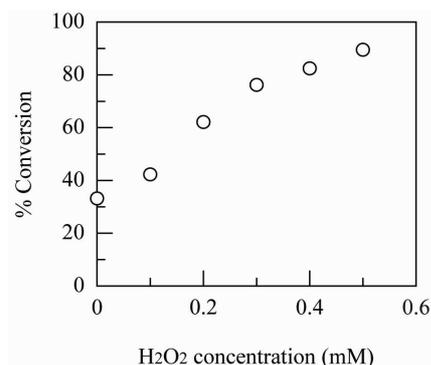


Figure 1 The effect of H₂O₂ concentration on quinone conversion by mushroom tyrosinase (200 U/cm³) for BPA (0.3 mM) solutions at pH 7.0 and 40 °C. Reaction time = 180 min.

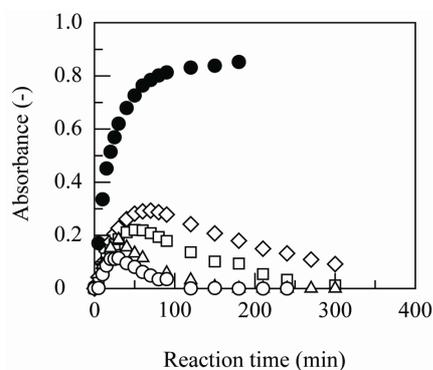


Figure 2 Removal of BPA through tyrosinase-catalyzed quinone conversion and quinone-adsorption on chitosan beads in the absence (●) and presence of chitosan beads of 0.025 (◇), 0.050 (□), 0.100 (△) and 0.150 (○) cm³/cm³ at pH 7.0 and 40 °C.

かった。以上の結果から、0.3mMのBPAをチロシナーゼによって処理する際の至適条件を過酸化水素濃度0.3mM、pH7.0、40℃と決定でき、さらにキトサンビーズを用いることで効果的にBPAを除去できることが明らかとなった。今後はBPAと構造の類似した種々のビスフェノール誘導体の除去について検討する予定である。

【参考文献】

- 1) S. Wada, H. Ichikawa, K. Tatsumi, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 304 (1995).
- 2) M. Jiménez, F. G. Carmona, *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33 (1996).
- 3) K. Yamada, A. Akiba, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823 (2005).