

ポリフェノールオキシダーゼによるキノン酸化と
キトサンビーズへの吸着を利用したビスフェノールAの除去

日大生産工 (院) ○マハサロ カノックワン
日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

環境汚染物質であるフェノール化合物は多くの工場施設から排出され、その中には内分泌かく乱懸念物質として人体や動物に対してエストロゲン作用を及ぼすことが報告されている。この中にはポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の原料として使われているビスフェノールA (BPA)があり、工場からの流出液中に含まれたり、埋め立て地やゴミ廃棄場からの浸出も発生源の一つとなっている。BPAの分解や除去法として吸着や光分解などの化学的手法が知られているが、近年BPAの転移を特異的に触媒化する酵素の利用が注目されている。酸化還元酵素の1つであるペルオキシダーゼは過酸化水素(H₂O₂)存在下でBPAをフェノキシラジカルに転化させ、さらにカップリング反応によって水に不溶なオリゴマーが形成する[1,2]。さらに我々はH₂O₂存在下でマッシュルーム由来のチロシナーゼがBPAを効率よくキノン酸化できることを見だし、キトサンビーズへのキノン吸着によってBPAを除去できることを報告した[3]。そこで、本研究では酸化還元酵素の一種であるポリフェノールオキシダーゼ(PPO)によるBPAのキノン酸化におけるpH、濃度、酵素濃度依存性を評価し、続いてBPAを除去するためのキトサンビーズの添加の効果を検討した。さらに本方法をビスフェノール誘導体の除去へ応用した。

【実験】

<試料および溶液調製>

PPOは,Worthington Biochemical 製のマッシュルーム由来のものを使用し、その比活性は820U/cm³であった。pH7.0のリン酸緩衝溶

液を用いて0.35mMのBPA溶液と1000U/cm³のPPO溶液を調製した。キトサンビーズ(富士紡績(株)製,粒径:70~200μm,比表面積:70~100m²/g)を購入し、所定のpHの緩衝溶液中に保存した。

<PPOによるBPAのキノン酸化>

BPA溶液にPPO溶液4.0cm³を加えることで酵素反応を開始させ([BPA]=0.3mM, [PPO]=100 U/cm³), 所定時間ごとに溶液を採取し、波長383nmでの吸光度で測定することによって酵素反応によるキノン酸化を評価した。さらに、BPA溶液に所定量のキトサンビーズを分散させた後にPPOを加え、キトサンビーズへのキノン吸着による除去を検討した。

<HPLC法による転化率の測定>

所定時間ごとに採取した溶液約0.4cm³を約80℃の温水に浸して酵素を失活させた後、マイクロシリンジで溶液20mm³をHPLCへ注入した。カラムとしてGLサイエンス(株)製のIntertsil ODS-3を用い、45vol%のアセトニトリル水溶液を流速1.0cm³/minで送液した。保持時間7.1分でのピーク面積から転化率を求めた。また、ビスフェノール誘導体においてはアセトニトリルの組成を変化させることで保持時間を7~8分に調節し、BPAと同様に求めた。

【結果および観察】

BPA溶液にPPOを加えるとH₂O₂不在下であってもキノンの形成を示す赤褐色への変色が見られたので、PPO濃度100U/cm³でBPAのキノン酸化のpHと温度依存性を評価した。BPAをキノン酸化させる際の至適pHと温度はpH7.0、40℃と決定できたので、この条件で酵素濃度を上昇させると、

Removal of bisphenol A through polyphenol oxidase-catalyzed quinone oxidation and subsequent quinone adsorption on chitosan beads

Kanokwan MAHASARO, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA,
and Kozunori YAMADA

BPAのキノンへの転化率は $100\text{U}/\text{cm}^3$ までは酵素濃度に比例したが、それ以上の濃度では上昇が緩やかとなった。 $100\text{U}/\text{cm}^3$ での転化率は反応時間3時間で85.7%に達した。

H_2O_2 不在下でPPOによってBPAがキノン酸化することがわかったので、PPOを含むBPA溶液にキトサンフィルムを浸漬し、UV-visibleスペクトルを測定した。キトサンのアミノ基に酵素反応によって形成したキノンが結合したことを示すピークが460nmに観察された。このピークはアミノ基をもたないセルロースフィルムでは観察されなかったことから、BPAから形成したキノンのキトサンへの結合にはアミノ基が関与することがわかった。

次にpH 7.0, 40°C でBPA溶液中にキトサンビーズを添加した後直ちに $100\text{U}/\text{cm}^3$ となるようにPPOを加え、BPAの除去を検討した。図1に示すように酵素反応によって形成したキノンがキトサンビーズに吸着することで、吸光度の上昇が大きく抑えられた。キノン吸着による吸光度の抑制はキトサンビーズが多いほど顕著であり、さらにキトサンビーズ $0.050\text{cm}^3/\text{cm}^3$ 以上でより短時間でBPAがキノン酸化され、キトサンビーズでBPAをほぼ完全に除去すること

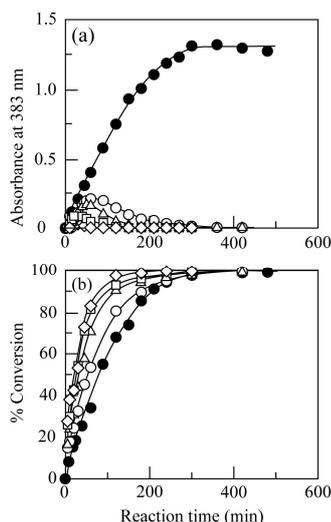


Figure 1 Changes in the absorbance and the % conversion with the reaction time for BPA (0.3mM) solutions containing PPO of $100\text{U}/\text{cm}^3$ in the absence (●) and the presence of chitosan beads of 0.025 (○), 0.050 (△), 0.100 (□), and 0.200 (◇) cm^3/cm^3 at pH 7.0 and 40°C .

ができた。pH 6.0, 40°C でBPA溶液にPPOとキトサン溶液を加えた均一系での反応では、キノンとキトサンの反応によって水に不溶な凝集体が形成するが、24時間攪拌し続けても溶液中に酵素反応によって形成したキノンが残存した。キトサンビーズを用いた不均一系では加えたビーズ量にも依るが反応時間3~7時間でBPAを完全に除去でき、キトサンビーズを用いる本方法がBPAの効果的な除去法であることがわかった。

さらに、BPAの至適条件であるpH 7.0, 40°C でPPOとキトサンビーズを加えて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を検討した結果、表1に示すようにBPB, BPE, BPF, BPO, BPT, BPZをキノン酸化でき、キトサンビーズを添加することで完全に除去することができた。

Table 1 Removal of bisphenol derivatives at the optimum conditions (pH 7.0 and 40°C) determined for BPA.

Bisphenol derivatives	Initial conc. (mM)	[PPO] (U/cm^3)	Chitosan beads (cm^3/cm^3)	Removal time (hr)	Removal (%)
bisphenol A (BPA)	0.30	100	0.05	7	100
		100	0.10	5	100
		100	0.20	4	100
bisphenol B (BPB)	0.30	150	0.10	5	100
		200	0.10	3	100
bisphenol C (BPC)	0.05	200	0.10	5	13
bisphenol E (BPE)	0.30	50	0.10	2	100
bisphenol F (BPF)	0.30	5	0.10	3	100
bisphenol O (BPO)	0.30	100	0.10	0.5	100
bisphenol S (BPS)	0.30	100	0.10	No reaction	
bisphenol T (BPT)	0.30	150	0.10	6	100
bisphenol Z (BPZ)	0.02	200	0.10	3	100
		200	0.10	5	100

【参考文献】

- 1) K. Yamada, N. Ikeda, Y. Takano, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Environ. Technol.*, **31**, 243 (2010).
- 2) C. Watanabe, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *Environ. Prog.*, in press.
- 3) M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **118**, 721 (2010).