

ポリフェノールオキシダーゼとキトサンを用いたビスフェノール A およびその誘導体の除去

日大生産工(院) ○木村 悠二
日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

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)は内分泌かく乱懸念物質とされており、生態系や生体内へ取り込まれた際の発癌性や遺伝毒性などが危惧されている。BPA の主な排出要因は、工業排水や産業廃棄物場からの溶出であり、化学的または生物学的な処理法が検討されているが、我々は小規模かつ低コストで行う方法として酵素反応を利用した除去法に着目している。これまでに酸化還元酵素であるペルオキシダーゼやチロシナーゼによる過酸化水素(H₂O₂)存在下での BPA の処理に関する報告はあるが^{1,2)}、ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)を用いた報告はほとんどない。そこで、本研究では、酸素存在下でクレゾラーゼ活性とカテコラーゼ活性の 2 段階の酵素活性をもつマッシュルーム由来の PPO を用いて BPA のキノン酸化を行った。PPO は種々のフェノール化合物をキノン酸化することができ、酵素反応によって形成したキノンはアミノ基と高く反応し、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る³⁾。そこで、我々は PPO によって BPA をキノン酸化させる際の pH、温度、酵素濃度などの至適条件を決定し、キトサンビーズへのキノン吸着による水溶液中からの BPA の除去を検討した。さらに本方法を種々の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>

Worthington Biochemical 社からマッシュルーム由来の PPO を購入し、その比活性は 965U/mg であった。異なる pH のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて 0.40mM の BPA、500U/cm³ の PPO 溶液を調製した。キトサンビーズ(粒径:70~200μm, 比表面積:70~100m²/g, 含水量:92.5%)は富士紡績株から購入し、緩衝溶液中に保存した。BPA とその誘導体は市販品をそのまま使用した。

<酵素反応によるキノン酸化>

BPA 溶液に PPO を加えることで酵素反応を開

始させ、所定時間ごとに波長 383nm での吸光度を測定し、pH、温度などの諸条件を変化させて BPA のキノン酸化における至適条件を決定した。さらにキトサンビーズを加えてキノン吸着による BPA の除去を検討し、本方法をビスフェノール誘導体の除去へ応用した。

<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 で処理して酵素を失活させた後、マイクロシリンジで 20mm³ を HPLC へ注入した。GL サイエンス(株)製の Inertsil ODS-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 分でのピーク面積から転化率を求めた。ビスフェノール誘導体においても保持時間が 6~8 分になるように設定し、それぞれの条件でピーク強度から転化率を求めた。

【結果および考察】

BPA 溶液に PPO を加えると H₂O₂ 不在化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、BPA のキノン酸化の pH、温度、酵素濃度依存性を評価した。pH に対する初速度と反応時間 3 時間での吸光度、転化率の変化を図 1 に示す。pH4.0 と 5.0 では PPO はほとんど活性を示さなかったが、pH を 5.0 から 7.0 へ上昇させると、反応時間 3 時間での吸光度と転化率は上昇し、pH7.0 の初速度は pH9.0 の約 1/3 であった。また、初速度は pH9.0 で最大となったが、反応時間 90 分以降で吸光度が横ばいになった。これは pH9.0 では反応初期での PPO の活性は高いが、PPO が溶液中で徐々に失活したことを示す。pH7.0~10.0 の範囲で反応時間 3 時間での転化率はほぼ一定であったが、反応時間 3 時間での吸光度は pH の上昇とともに低下した。この pH 範囲の中で、pH7.0 での初速度は pH9.0 より小さいが、吸光度が反応時間に対して上昇し続けたので、至適 pH を 7.0 として BPA のキノン酸化の温度依存性を評価した。温度に対する初速度と反応時間 3 時間での吸光度、転化率の変化を図 2 に示す。反応時間 3 時間での吸光度と転化率は

Removal of bisphenol A and its derivatives by combined use of polyphenol oxidase and chitosan

Yuji KIMURA, Ayumi KASHIWADA,
Kiyomi MATSUDA, and Kazunori YAMADA

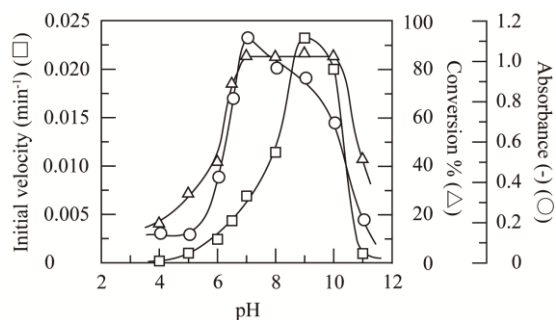


Figure 1 The effect of pH value on PPO-catalyzed (100 U/cm^3) quinone oxidation of BPA (0.30 mM) at 40°C .

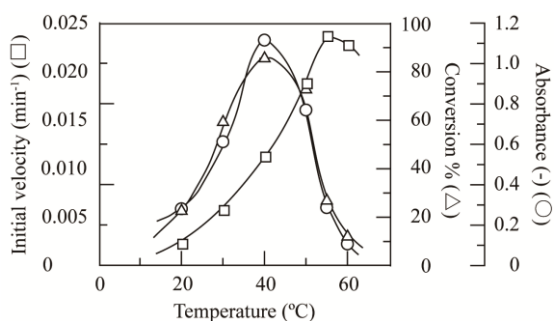


Figure 2 The effect of temperature on PPO-catalyzed (100 U/cm^3) quinone oxidation of BPA (0.30 mM) at pH 7.0.

40°C で最大となった。温度が 40°C を越えると PPO が熱変性によって失活し、活性が低下した。また、初速度は 55°C より低いが、 40°C では反応時間 3 時間の間で吸光度が上昇し続け、転化率が最大となったので、至適温度を 40°C に決定した。pH7.0、 40°C の至適条件においてキトサンビーズを添加したときの反応時間に対する吸光度と転化率の変化を図 3 に示す。キトサンビーズを添加することによって吸光度がゼロとなり、反応時間 5 時間で BPA を完全に除去できた。この時の初速度はキトサンビーズを添加しない時の 2.46 倍となり、キノン吸着によって溶液中の

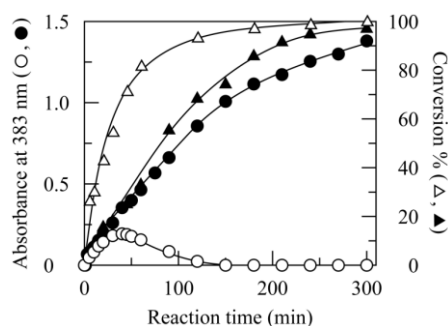


Figure 3 The time course of the absorbance at 383 nm and conversion % value for BPA (0.30 mM) solutions containing and PPO (100 U/cm^3) in the absence (○, ●) and presence (△, ▲) of chitosan beads of $0.10 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ at pH7.0 and 40°C .

キノン濃度が低下することで、酵素の反応速度が上昇したことがわかった。また、キトサンビーズ量が多いほど BPA の除去率は高く、除去時間が短縮された。

また、対照実験としてキトサンビーズの代わりにキトサン溶液を加えると、キトサンとの凝集反応によって BPA を除去できたが、キトサンビーズを用いたときより長時間を要し、BPA を効果的に除去するためのキトサンの濃度範囲も限られることから、キトサンビーズを用いる本方法が効果的であることがわかった。

さらに、ビスフェノール誘導体についても至適条件の検討を行い除去を検討した結果、表 1 に示すように多くのビスフェノール誘導体をキノン酸化でき、それぞれの至適条件下でキトサンビーズを添加することで完全に除去できた。

Table 1 Removal of BPA and bisphenol derivatives through PPO-catalyzed quinone oxidation and subsequent quinone adsorption on chitosan beads.

| Bisphenol derivative | Init. conc. (mM) | pH | Temperature ($^\circ\text{C}$) | [PPO] (U/cm^3) | Chitosan beads (cm^3/cm^3) | Removal time (hr) | Removal % |
|----------------------|------------------|-----|----------------------------------|---------------------------|--|-------------------|-----------|
| BPA | 0.30 | 7.0 | 40 | 100 | 0.05 | 7 | 100 |
| | | | | | 0.10 | 5 | 100 |
| | | | | | 0.20 | 4 | 100 |
| BPB | 0.30 | 7.0 | 40 | 100 | 0.10 | 5 | 93.0 |
| | | | | | 0.20 | 5 | 100 |
| | | | | | 150 | 0.10 | 3 |
| BPC | 0.05 | 7.0 | 30 | 300 | 0.10 | 8 | 88.8 |
| | | | | | 0.10 | 8 | 95.5 |
| | | | | | 0.20 | 9 | 100 |
| BPE | 0.30 | 7.0 | 40 | 10 | 0.10 | 5 | 100 |
| | | | | | 20 | 0.10 | 1 |
| BPF | 0.30 | 7.0 | 40 | 4 | 0.10 | 3 | 100 |
| | | | | | 6 | 0.10 | 1.5 |
| BPO | 0.30 | 7.0 | 40 | 50 | 0.10 | 2 | 100 |
| | | | | | 100 | 0.10 | 0.5 |
| BPT | 0.30 | 8.0 | 30 | 100 | 0.10 | 5 | 89.3 |
| | | | | | 125 | 0.10 | 1.5 |
| BPZ | 0.02 | 7.0 | 40 | 20 | 0.10 | 5 | 89.5 |
| | | | | | 40 | 0.10 | 5 |

【結論】

上記の結果から、マッシュルーム由来の PPO による BPA のキノン酸化における至適条件は、pH7.0、 40°C と決定できた。また、キトサンビーズを添加すると酵素活性が上昇し、酵素濃度 100 U/cm^3 以上で BPA を完全に除去できることが明らかとなった。また、ビスフェノール誘導体においても至適条件決定後、キトサンビーズを添加することで完全に除去できた。このことから、BPA およびその誘導体に対して酵素反応を利用した除去法として応用できると考えられる。

【参考文献】

- 1) M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **118**, 721 (2010).
- 2) K. Yamada, N. Ikeda, Y. Takano, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Environ. Technol.*, **31**, 243 (2010).
- 3) M. Jiménez, F. G. Carmona, *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33 (1996).