

カワラタケ由来のラッカーゼによるビスフェノール A および

その誘導体の処理と除去

日大生産工(院) ○高橋あゆみ

日大生産工 木村悠二 柏田 歩 山田和典

【緒論】ビスフェノール A(BPA)はエポキシ樹脂やポリカーボネート樹脂の合成原料であり、体内に取り込まれると発がん性や遺伝子異常などを引き起こす内分泌かく乱作用が危惧されている。また、BPA と構造が類似することから種々の BPA 誘導体にも同様に内分泌かく乱作用があることが報告されており[1]、除去が求められている。これまでの除去法としてオゾン酸化、光酸化などの化学的処理法や活性汚泥、細菌分解などの生物学的処理法が報告されているが、低効率や未反応物質、分解生成物の残存などの問題があるので、本研究では酸化還元酵素の利用に注目した。酸化還元酵素は生態環境に近い常温、中性付近で高い触媒効率を示し、BPA の処理にはチロシナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ[2]、ラッカーゼなどが用いられている。ペルオキシダーゼとラッカーゼはフェノール化合物をラジカル化し、生成したフェノキシラジカルのカップリング反応により水に不溶性オリゴマーを形成する。ペルオキシダーゼでは過酸化水素(H_2O_2)を必要とするが、ラッカーゼは H_2O_2 不在下でフェノール化合物に対して触媒作用を示すので、本研究ではラッカーゼによって BPA をラジカル化する際の pH、温度、酵素濃度などの至適条件を決定し、形成したオリゴマーの除去方法を検討した。また、ポリエチレングリコール(PEG)存在下での至適条件の検討から、PEG の添加による酵素活性の保持の効果を調べた[3]。さらに、この方法を BPA 誘導体の除去に応用した。

【実験】Sigma-Aldrich(株)から比活性が 13.6 U/mg のカワラタケ由来のラッカーゼを購入した。異なる pH のリン酸緩衝溶液(0.01M)を溶媒として、BPA、ラッカーゼおよび PEG 溶液を調製し、PEG 不在下と存在下で BPA 溶

液にラッカーゼ溶液を加えて酵素反応を開始した。所定時間ごとに 600nm における吸光度を測定し、濁度を算出した。また、所定時間ごとに採取した溶液から形成した不溶性のオリゴマーを除去した後、4-アミノアンチピリン(4AA)法と HPLC 法により BPA の残留濃度を算出した。さらに、ビシンコニン酸により反応溶液中の酵素濃度を定量した。また、PEG 不在下、存在下で形成した不溶性オリゴマーの IR を測定した。

【結果および考察】 H_2O_2 不在下で BPA 溶液にラッカーゼを加えると、ラジカル化とカップリング反応によって不溶性のオリゴマーが形成して溶液が白濁した。さらに、PEG を含む BPA 溶液にラッカーゼを加えると、溶液の濁度が急激に上昇したので、PEG 不在下と存在下で pH、温度、酵素濃度([E])依存性を評価した。PEG 不在下($1.0U/cm^3$)と存在下($0.05U/cm^3$)での pH に対する反応時間 1 時間での BPA の残留率と初速度の変化を図 1 に示す。PEG 不在下では pH7.0 で BPA の残留率が最も低くなり初速度が最大となったので、至適 pH は 7.0 と決定でき、PEG を添加すると至適 pH は 5.0 となった。図 2 に PEG 不在下と存在下での温度に対する BPA の残留率と初速度の変化を示す。初速度はいずれの場合も温度の上昇とともに高くなったが、40℃ で残留率が最も低くなったので、至適温度を 40℃ に決定した。さらに、添加した PEG の分子量および濃度依存性を検討した結果、分子量は 10K、濃度は $0.10 mg/cm^3$ が至適値となった。図 3, 4 に示すように決定した至適条件で酵素濃度依存性を検討した結果、PEG 不在下では $1.0U/cm^3$ で 3 時間で BPA が処理され、形成したオリゴマーはろ紙(規格:5C)で除去できた。同様に、PEG 存在下では $0.02U/cm^3$ では 6 時間で、 $0.05U/cm^3$

Treatment and removal of bisphenol A and its derivatives

by laccase from *Trametes versicolor*

Ayumi TAKAHASHI, Yuji KIMURA, Ayumi KASHIWADA and Kazunori YAMADA

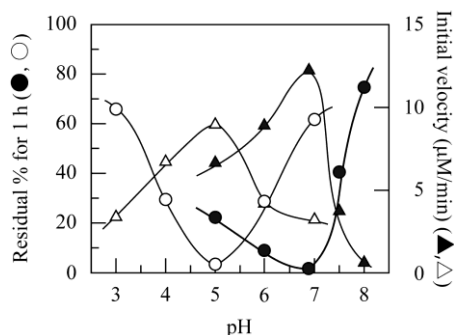


Figure 1 The effect of the pH value on treatment of BPA at 40°C in the absence ($[E]=1.0 \text{ U/cm}^3$) (shaded) and presence ($[E]=0.05 \text{ U/cm}^3$) (open) of 10K-PEG.

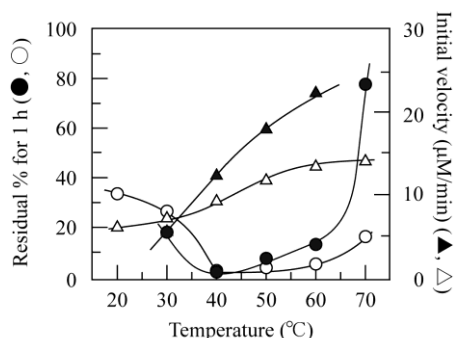


Figure 2 The effect of the temperature on treatment of BPA at pH 7.0 in the absence ($[E]=1.0 \text{ U/cm}^3$) (shaded) 10K-PEG and at pH 5.0 in the presence of ($[E]=0.05 \text{ U/cm}^3$) (open) 10K-PEG.

では2時間でBPAを処理できた。これらの結果から、酵素濃度の増加によって処理時間を短縮でき、PEGの添加によって酵素濃度を1/50に低減できることがわかった。さらに、PEG存在下で形成したオリゴマーは酵素処理後、溶液のpHを3に低下させて攪拌した後ろ紙で除去できた。

pH7.0, 40°Cで酵素濃度を 1.0 U/cm^3 としてPEG不在下と存在下でBPAを処理した後の酵素濃度を定量した結果、PEG存在下の方が酵素濃度が高かったことから、PEGを添加することによって形成したオリゴマーに酵素が取り込まれにくくなったと考えられる。さらに、PEG不在下と存在下で形成したオリゴマーのIR測定から、PEG存在下で形成したオリゴマーではPEG不在下で観察されなかったピークが観察され、PEGのピークと重なった。これは形成したオリゴマー中にPEGが取り込まれたことを示す。

本方法を種々のBPA誘導体の除去に応用した。その結果、pH5.0, 40°C, 10K-PEG 0.10 mg/cm^3 存在下でビスフェノールB, ビスフェノールE, ビスフェノールF, ビスフェノール

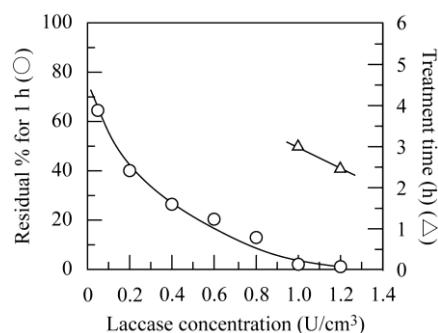


Figure 3 The effect of the laccase concentration on treatment of BPA at pH 7.0 and 40°C in the absence of PEG.

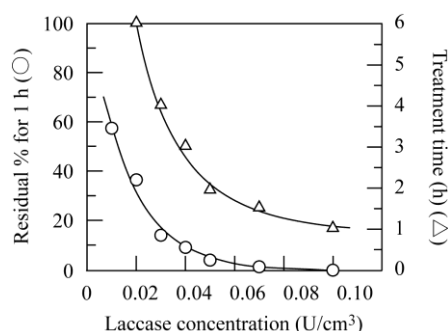


Figure 4 The effect of the laccase concentration on treatment of BPA at pH 5.0 and 40°C in the presence of 10K-PEG.

O, ビスフェノール T を $0.0015 \sim 0.025 \text{ U/cm}^3$ で完全に処理でき、pHを3にしてろ過すると除去できた。

【結論】上記の結果から、カワラタケ由来のラッカーゼによるBPAの処理における至適条件は、PEG不在下ではpH7.0, 40°C, PEG存在下ではpH5.0, 40°Cと決定でき、添加するPEGの分子量は10K, 濃度は 0.10 mg/cm^3 が最適であることがわかった。また、添加したPEGはオリゴマーと水素結合により複合体を形成し酵素をオリゴマーに取り込まれにくくすることで酵素活性の低下を抑制できると考えられる。また、本方法は種々のBPA誘導体の除去にも有効であることが明らかとなった。

【参考文献】

- [1] S. Kitamura, T. Suzuki, S. Sanoh, R. Kohta, N. Jinno, K. Sugihara, S. Yoshihara, N. Fujimoto, H. Watanabe, and S. Ohta, *Toxicol. Sci.*, **84** 249, (2005).
- [2] K. Yamada, N. Ikeda, Y. Takano, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Environ. Technol.*, **31**, 243 (2010).
- [3] Y. J. Kim, J. A. Nicell, *Proc. Biochem.*, **41**, 1029 (2006).