

酸化還元酵素と形状の異なるキトサンを用いた 内分泌かく乱懸念物質の除去

日大生産工(院) ○対馬 美月
日大生産工 木村悠二 柏田 歩 山田和典

【緒論】

ベンゼン環に一つの炭化水素基が置換しているモノアルキルフェノール類は、合成樹脂、医薬品、香料などの原料として広く用いられている。しかし、これらの中には内分泌かく乱作用を示すものがあり、特に、分岐状は直鎖状よりも毒性が高いことが報告されているので、その除去が求められている。従来の除去法として電気分解、オゾン酸化法、活性汚泥法、活性炭吸着などが挙げられるが、コスト高、副生成物の生成や分解生成物の残存といった問題点がある。そこで本研究では、より環境負荷が少なく効率的な除去法として、酸化還元酵素とキトサンを用いた酵素反応による除去の利用に着目した^{1,2)}。酸化還元酵素であるポリフェノールオキシダーゼ(PPO)を用いて酵素反応を行い、生成したキノンをさまざまな形状のキトサンに吸着させ、反応系からの除去を目指した。始めに、分岐状アルキルフェノールの中でもエストロゲン作用が高いことが報告されている 4-tert-ペンチルフェノール(4TPP)の除去を行い、他の分岐状アルキルフェノール類の除去も検討した。

【実験】

<試料および溶液調製>

Sigma-Aldrich (株)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。pH7.0のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて、0.40mMの4TPP溶液、150U/cm³のPPO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。さらに、大日本精化工業(株)から提供されたキトサン粉末(粒径:10~42, 42~74, 74~100μm)と和光純薬工業(株)製のキトサン300より調製したキトサン溶液を使用した。

<酵素反応によるキノン酸化>

4TPP溶液にPPO溶液を加え、pH7.0, 40℃の条件で酵素反応を開始させた。所定時間ごとに

4TPPから生成したキノンの最大吸収波長である399nmで吸光度を測定し、キノン生成の尺度を求め、酵素濃度依存性を検討した。

<HPLC 法による転化率の決定>

所定時間ごとに採取した反応溶液を 100℃の恒温槽に 1 分間浸して酵素を失活させた後、(株)日立製作所製 L-7000 シリーズ HPLC に注入した。GL サイエンス(株)製の逆相カラム Inertsil ODS-3 を用いて 60%アセトニトリル水溶液を流速 1.0cm³/min で送液し、保持時間 7.6 分でのピーク面積から転化率を求めた。

<形状を変えたキトサンによる除去>

pH7.0, 40℃ の条件で、キトサンビーズ 0.10cm³/cm³ に相当するキトサン粉末 0.0075g/cm³ を添加して酵素反応を行った。また、pH6.0 の 4TPP と PPO 混合溶液に、アミノ基濃度が 0.05~3.0mM となるようにキトサン溶液を加えて 24 時間攪拌し、形成した不溶性の凝集体をろ過したあと、399nm で吸光度を測定した。

<他の分岐状アルキルフェノール類の除去>

0.40mM の 4-iso-プロピルフェノール(4IPP), 4-sec-ブチルフェノール(4SBP)および 4-tert-ブチルフェノール(4TBP)溶液を調製した。上記と同様に酵素反応させ、酵素濃度とキトサンビーズ量を変えて反応効率を検討した。

【結果および考察】

4TPP 溶液に PPO を加えると、吸光度と転化率は反応時間とともに上昇し、4TPP が PPO によってキノン酸化された。酵素濃度 30U/cm³ で 4TPP を処理した際の吸光度と転化率の経時変化を図 1 に示す。キトサンビーズ不在下では、転化率は反応時間 360 分で 94.6%にとどまったが、0.10cm³/cm³ のキトサンビーズ存在下では、吸光度はゼロとなり、転化率は 180 分で 100%に達し完全に除去された。キトサンビーズへキノンが吸着することによって、溶液中のキノン濃度が低下し、酵素活性の低下が抑えられ酵素反応が長く続

Removal of Suspected Endocrine Disrupting Chemicals by Combined Use of
An Oxidoreductase and Chitosan Samples in Different Forms

Mitsuki TSUSHIMA, Yuji KIMURA, Ayumi KASHIWADA, Kazunori YAMADA

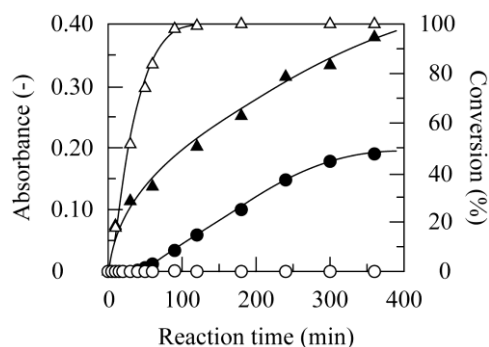


Figure 1 The time course of absorbance at 399 nm (circle) and conversion % value (triangle) for 4TPP (0.30 mM) solution containing PPO (30 U/cm³) in the absence (shaded) and presence (opened) of chitosan beads of 0.10 cm³/cm³ at pH 7.0 and 40°C.

くことがわかった。さらに、ビーズ量の増加や、酵素濃度の上昇により除去するのに要する時間を短縮することができた。

次に、粒径 74~100 μ m(比表面積 0.06m²/g)のキトサン粉末を用いて 4TPP を処理した際の吸光度と転化率の経時変化を図 2 に示す。吸光度は反応時間 3 時間でゼロとなり、転化率は 6 時間で 100%に達した。したがって、キトサンビーズよりも大幅に比表面積の小さなキトサン粉末を用いても 4TPP を除去することがわかった。また、キトサン溶液を加えた際のアミノ基濃度に対する吸光度の変化を図 3 に示す。吸光度は、[NH₂]/[4TPP]=1.75 のときに最も低くなり、この濃度での経時変化を調べると、反応時間 6 時間のとき 0.075 であり凝集体は形成していなかった。以上の結果より、均一系より不均一系からの除去の方が効率的に 4TPP を除去できると考えられる。

本研究を用いて 4TPP を完全に除去できたので、他のアルキルフェノールでの除去を試みた。0.10cm³/cm³のキトサンビーズ存在下で 4IPP, 4SBP は酵素濃度 10U/cm³, 反応時間 5 時間, 4TBP は 20U/cm³, 反応時間 5 時間で転化されたが、吸光度がわずかに残り完全に除去することはできなかった。これは、形成したキノンの一部がロイコキノンなどの副生成物に変換したと考えられる³⁾。また、4TPP, 4TBP, 4SBP, 4IPP の順に高い酵素濃度が必要であり、アルキル鎖が長いと高い添加効率を得るために高い酵素濃度が必要であると考えられる。

【結論】

上記の結果から、マッシュルーム由来の PPO により 4TPP をキノン酸化できたことが確認された。また、キトサンビーズを加えると、酵素反応によって形成したキノンがキトサンに吸着することで、溶液中から 4TPP を

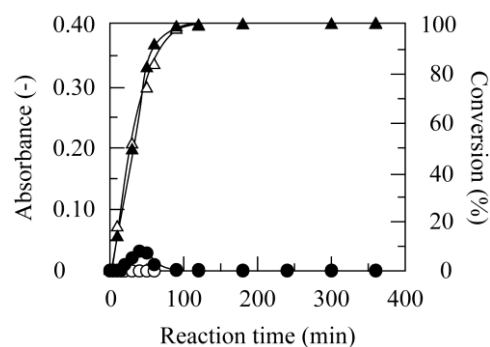


Figure 2 The time course of absorbance at 399 nm (circle) and conversion % value (triangle) for 4TPP (0.30 mM) solution containing PPO (30 U/cm³) in the presence of chitosan powder of 0.0075 g/cm³ (shaded) and chitosan beads of 0.10 cm³/cm³ (opened) at pH 7.0 and 40°C.

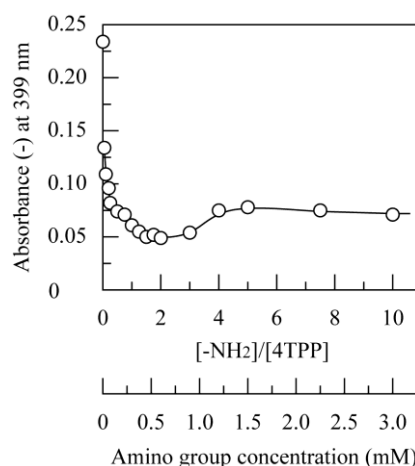


Figure 3 Removal of 4TPP (0.30 mM) through PPO-catalyzed quinone oxidation (30 U/cm³) and subsequent homogeneous quinone reaction with chitosan at pH 6.0 and 40°C.

除去できた。除去する際にはキトサン溶液による均一系より、キトサンビーズやキトサン粉末を用いた不均一系での除去の方が効果的であった。さらに、同じ条件で他の分岐状アルキルフェノール類の除去を行った結果、吸光度はゼロにならず、完全に除去できなかった。今後、キトサンビーズの添加量の増加や副生成物が生成しない pH や温度の検討による完全除去を目指す。また、直鎖状アルキルフェノールに対しても酸化還元酵素とキトサンビーズを併用した除去を検討する。

【参考文献】

- 1) K. Yamada, N. Ikeda, Y. Takano, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Environ. Technol.*, **31**, 243-256 (2010).
- 2) M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **118**, 721-732 (2010).
- 3) M. Jiménez, F. García-Carmona, *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33-39 (1996).