

酵素反応によるビスフェノール A および誘導体の処理と除去

日大生産工(院) ○池田 尚也

日大生産工 柏田 歩・松田 清美・平田 光男・山田 和典

【緒論】

化学物質の生態系や人の健康への影響が懸念されている中で、エストロゲン様作用を有するビスフェノール A (2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン) (BPA) の簡易的な除去法の確立が求められている。BPA は主にエポキシ樹脂やポリカーボネート樹脂の原料として、また缶詰の内部コーティングに至るまで日常生活のなかで幅広く使用されている¹⁾。

BPA の処理には、吸着、電気分解、光酸化などの化学的処理法や微生物による生物学的処理法などが用いられているが、方法によっては設備の大型化、低効率によるコスト高といった問題がある。

一方、酵素による処理法では、アルキルフェノールやクロロフェノールを対象としてチロシナーゼやペルオキシダーゼなどの酸化還元酵素の利用が報告されているが^{2)~4)}、BPA の除去に関する報告は少なく⁵⁾、さらに材料の高機能化を目的に近年利用が高まっているビスフェノール誘導体の処理に関する報告はほとんどない。そこで、我々は BPA およびその誘導体の酵素反応による処理に注目した。ペルオキシダーゼは過酸化水素(H₂O₂)存在下で種々のフェノール化合物をラジカル化させ、生成したラジカルのカップリング反応により水不溶性のオリゴマーが形成することが知られている^{4,5)}。

本研究では、低コストで短時間の処理が可能であると考え、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)による BPA の除去における諸条件を検討し、本手法を確立するとともに、種々のビスフェノール誘導体の除去へ本方法を応用した。

【実験】

pH6.0 のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて BPA(5.0mM)、HRP(20U/cm³)、H₂O₂ (20mM)およ

び分子量 1.0×10⁴ のポリエチレングリコール(1.0mg/cm³) (10K-PEG)溶液を調製した。また、BPA の水に対する溶解性が低いため、5.0mM の BPA 溶液は緩衝溶液にエタノール(反応系中で 30vol%)を加えて調製した。BPA、HRP および 10K-PEG を表 1 に示す濃度になるように混合し、30℃で恒温にした後、H₂O₂ 溶液を加えることによって酵素反応を開始させた。

Table 1 Concentration of each component in a typical reaction solution

Component	Concentration
Bisphenol A (BPA)	2.5mM
Peroxidase	1.0U/cm ³
10K-PEG	0.1mg/cm ³
H ₂ O ₂	2.5mM

<濁度の測定>

所定時間ごとに反応溶液を採取し、波長 600nm での吸光度から、(1)式により濁度を算出した。測定後、溶液は直ちに反応系中に戻した。

$$\tau = -\ln \frac{10^{-\text{Abs}}}{I} \quad (1)$$

τ : Turbidity (cm⁻¹), Abs: Absorbance (-)

I : Cell length (cm)

<残留濃度の定量>

所定時間ごとに反応溶液から採取した溶液 0.4cm³ にカタラーゼ溶液を加えてペルオキシダーゼの活性を停止させた後、ウルトラフィルターユニット(Advantec (株)製、分画分子量 1.0×10⁴)でろ過することにより、生成したオリゴマーと溶液中の酵素を除去した。BPA の残留濃度は、4-アミノアンチピリン法(4AA 法)と液体クロマトグラフィー法(HPLC 法)によって測定し、初期濃度との比から残留率を求めた。

Treatment and removal of bisphenol A and its derivatives with enzymatic reaction

Naoya IKEDA, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA,
Mitsuo HIRATA, and Kazunori YAMADA

【結果および考察】

H₂O₂ 存在下で BPA 溶液に HRP を加えると、不溶性オリゴマーの生成による濁度の上昇が見られ、反応時間とともに残留率は低下した。

2.5mM の BPA 溶液(溶媒中のエタノール組成：30vol%)において諸条件を検討した結果、pH6.0、温度 30°C、HRP 濃度 1.0U/cm³、10K-PEG 濃度 0.1mg/cm³、H₂O₂ 濃度 2.5mM([BPA]/[H₂O₂]=1.0)の条件において反応時間 180 分で BPA は HRP により完全に処理された。この際、酵素酸化させるための H₂O₂ 量が不足すると未反応の BPA が溶液中に残留し、逆に H₂O₂ が過剰に存在すると、HRP の一部が不活性な形態をとり、反応が遅延するので、残留率は上昇した⁶⁾。また、10K-PEG を添加することで酵素との複合体が形成して酵素とラジカルとの相互作用を緩和でき、また不溶性オリゴマーへの酵素の取り込みを防ぐことができるので、結果的に酵素の活性が保持され⁷⁾、PEG 濃度が上昇するにつれて残留率が上昇した。

また、BPA を処理する際に決定した至適条件を用いて種々のビスフェノール誘導体の除去を検討した結果、活性の低い場合には HRP 濃度を上昇させることで、高く処理することができた。

さらに、有機溶媒を含まない水溶液中での BPA(0.3mM)の処理を検討した結果、濃度比が [BPA]/[H₂O₂]=1.0 となる H₂O₂ 濃度 0.3mM で最も効率的に BPA が処理され、HRP 濃度 0.1U/cm³ では 120 分で BPA をほぼ完全に処理できた。同様に種々のビスフェノール誘導体の処理を行った結果を表 2 にまとめた。

本研究では 13 種類のビスフェノール誘導体を用いたが、そのうち 9 種類は HRP で完全に処理できた。BPE、BPF では 0.1U/cm³ で 97.4~99.5% まで処理することができたが、HRP 濃度を 0.1U/cm³ 以上にしても完全に処理することはできなかった。BPS と 2,4'-ジヒドロキシジフェニルスルホン は 20U/cm³ まで HRP を上昇させることで、それぞれ 55.5%、74.3% まで除去率を上昇することができた。しかし、HRP 濃度や 10K-PEG 濃度をさらに上昇させても除去率の顕著な上昇は見られなかった。これらのビスフェノール誘導体を完全に処理するには、個々の誘導体に対して至適条件を検討するか、由来の異なるペルオキシダーゼを用いるなどの方法が考えられる

が、本研究において HRP によって多くのビスフェノール誘導体を処理することができることが 1 つの結論となる。また、処理後の溶液の pH を塩酸で 4.0 まで低下させると生成したオリゴマーが凝集しやすくなるので、ろ紙で容易にろ別することができた。溶液の吸光度は著しく低下し(BPA では 0.012 まで低下)、無色透明な溶液が得られた。

以上の結果より、本方法は HRP を使用することにより BPA およびその誘導体を高く除去できることを明らかにした。

Table 2 Removal of bisphenol derivatives under the optimum conditions determined for bisphenol A from aqueous solutions

Bisphenol derivatives (0.3mM)	[HRP] (U/cm ³)	% removal
bisphenol A (BPA)	0.1	100
bisphenol B (BPB)	0.03	100
bisphenol C (BPC) (0.05mM)	0.01	100
bisphenol E (BPE)	0.1	99.5
bisphenol F (BPF)	0.1	97.4
bisphenol S (BPS)	20	55.5
bisphenol T (BPT)	0.5	100
bisphenol Z (BPZ) (0.01mM)	0.05	100
diphenolic acid	1.5	100
2,4'-dihydroxydiphenylsulfone	20	74.3
2,4'-dihydroxydiphenylmethane	0.5	100
2,4'-dihydroxybenzophenone	2.0	100
4,4'-dihydroxybenzophenone	1.0	100
4,4'-dihydroxydiphenylether	0.001	100

【参考文献】

- 1) J. H. Kang, F. Kondo, and Y. Katayama, *Toxicology*, **226**, 83 (2006).
- 2) G. F. Payne and W. Q. Sun, *Appl. Environ. Microb.*, **60**, 397 (1994).
- 3) K. Yamada, T. Inoue, Y. Akiba, A. Kashiwada, K. Matsuda, and M. Hirata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2467 (2006).
- 4) K. Yamada, T. Shibuya, M. Noda, N. Uchiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, and M. Hirata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2503 (2007).
- 5) C. Nicole, J. K. Bewtra, N. Biswas, and K. E. Taylor, *Water Res.*, **33**, 13, (1999).
- 6) S. Nakamoto, and N. Machida, *Water Res.*, **26**, 49 (1992).
- 7) J. A. Nicell, and *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **60**, 204 (1994).