

酵素反応とキトサンビーズへの吸着によるビスフェノール A およびその誘導体の除去

日大生産工(院) ○鈴木 瑞穂
日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

哺乳瓶や缶詰のコーティングに使用されている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, 2,2-ビス(ヒドロキシフェニル)プロパン)には内分泌かく乱作用があるとされ、生体内に取り込まれると癌や遺伝毒性を引き起こす可能性がある。また、高温下や水蒸気との接触によりポリカーボネートやエポキシ樹脂から分解し、溶出することもある。

BPA の主な排出要因は、工業排水、環境中での自然分解、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注目した。本研究では酸化還元酵素の一種で、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チロシナーゼを用いた。マッシュルームチロシナーゼ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¹⁻³⁾、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するため、キトサンビーズへのキノン吸着によって効果的にフェノール化合物を除去できる³⁾。本研究ではマッシュルームチロシナーゼによって BPA をキノン酸化させる際の過酸化水素(H₂O₂)濃度、pH、温度、酵素濃度などの至適条件を決定した後、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、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>

チロシナーゼは Sigma 社からマッシュルーム由来のものを購入し、その比活性は 2870U/mg であった。異なる pH のリン酸緩衝溶液(0.01M)を

用いて 0.4mM の BPA、2000U/cm³ のチロシナーゼおよび 6.0mM の H₂O₂ 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)は富士紡績(株)から購入し、緩衝溶液中に保存した。BPA とビスフェノール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 H₂O₂ とチロシナーゼを加えることによって酵素反応を開始させた。所定時間ごとに反応溶液の UV-visible スペクトル(190～600nm)を測定し、波長 385nm での吸光度の上昇をキノン形成の尺度とした。H₂O₂ 濃度、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、さらにキトサンビーズを加えた除去実験を BPA とビスフェノール誘導体を対象に行った。

<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 の恒温槽中に数分間浸して酵素を失活させた後、マイクロシリンジを用いてこの溶液 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。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 と同様に転化率を求めた。

【結果および考察】

BPA は H₂O₂ 不在下でもチロシナーゼによって緩やかに酸化されるが、H₂O₂ を加えるとキノン酸化が上昇した。これは H₂O₂ の添加によって met 体として存在するチロシナーゼが oxy 体に変

Removal of bisphenol A and its derivatives
by enzymatic reaction and adsorption on chitosan beads

Mizuho SUZUKI, Ayumi KASHIWADA,
Kiyomi MATSUDA, and Kazunori YAMADA

換され、酵素のキノン形成サイクルが循環するためである²⁾。ここで、転化率は H₂O₂ 濃度に対して直線的に上昇したが、[H₂O₂]/[BPA]=1.0 以上では上昇が緩やかとなったので至適 H₂O₂ 濃度を 0.3mM と決定した。さらに BPA をキノン酸化させる際の至適 pH と温度を検討した結果、pH7.0、40°C で転化率が最大となったことから、これらの値を至適条件と決定した。また、キノン酸化の比初速度は酵素濃度 200U/cm³ 以下では直線的に上昇し、200U/cm³ で最大となったので、この値を至適酵素濃度とした。

次に pH7.0、40°C でキトサンビーズの添加による BPA の除去を検討した。図 1 に示すようにキトサンビーズを加えるとキノン形成を示す波長 385nm の吸光度の上昇は抑えられた。吸光度はキトサンビーズ量が増加するにつれて短時間で低下し、キトサンビーズ量 0.10cm³/cm³ 以上で形成したキノンが完全に吸着された。

UV-visible スペクトル測定においてチロシナーゼと H₂O₂ を含む BPA 溶液に浸漬したキトサンフィルムでは波長 460nm にキノンの結合を示すピークが観察されたのに対し、アミノ基を持たないセルロースフィルムではこのピークが観察されなかったため、キトサン中のアミノ基がキノン吸着に関与することが分かった。また、キトサンビーズ量が増加するにつれて BPA のキノンへの転化率が上昇し、キトサンビーズ量 0.10cm³/cm³ では反応時間 5 時間で BPA を完全に除去でき、このときの初速度はキトサンビーズが不在のときに比べて 2.45 倍大きくなった。この結果はキノン吸着によって溶液中のキノン濃

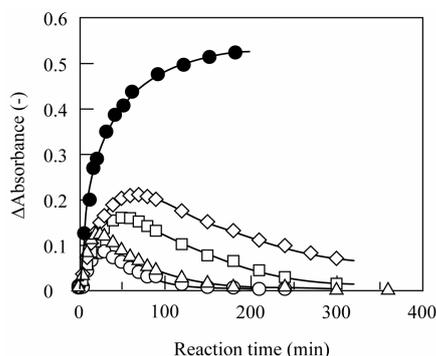


Figure 1 Removal of BPA through tyrosinase-catalyzed quinone oxidation and quinone-adsorption on chitosan beads in the absence (●) and presence of chitosan beads of 0.025 (◇), 0.050 (□), 0.10 (△), and 0.15 (○) cm³/cm³ at pH 7.0 and 40°C.

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

Bisphenol derivatives	Initial conc. (mM)	Tyrosinase conc. (U/cm ³)	Chitosan beads (cm ³ /cm ³)	Removal time (hr)	Removal (%)
bisphenol A (BPA)	0.3	200	0.10	5	100
bisphenol B (BPB)	0.3	200	0.10	5	61.5
		400	0.20	18	72.1
bisphenol C (BPC)	0.05	200	0.10	5	68.2
		300	0.10	3	89.2
bisphenol E (BPE)	0.3	50	0.10	5	100
		50	0.20	5	95.9
bisphenol F (BPF)	0.3	50	0.10	5.5	100
		30	0.10	3	100
bisphenol O (BPO)	0.3	200	0.10	5	94.3
bisphenol S (BPS)	0.3	200	0.10	5	0.2
bisphenol T (BPT)	0.3	200	0.10	3	100
bisphenol Z (BPZ)	0.02	200	0.10	5	59.8
		300	0.10	5	88.6

度が低下することで、酵素の反応速度が上昇したことを示す⁴⁾。また、対照実験としてキトサン溶液を用いて除去実験を行った結果、24 時間後においても少量のキノンが溶液中に残存し、効果的な除去を行うにはあらかじめ BPA 濃度を決定する必要があることから、不均一系である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分かった。

さらに、BPA において決定した至適条件を BPA と構造の類似したビスフェノール誘導体の除去に応用した結果を表 1 にまとめた。表 1 に示すように BPE、BPF、BPO、BPT を完全に除去することができ、BPB、BPC、BPZ においてもキトサンビーズ量や酵素濃度を増加させることで効果的に除去することができた。この中で除去率の低い BPC と BPZ においては、至適 pH を決定後 (pH8.0)、酵素濃度を増加させることで除去率を BPC では 97% まで、BPZ では 94% まで上昇させることができた。

【参考文献】

- 1) S. Wada, H. Ichikawa, K. Tatsumi, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 304 (1995).
- 2) M. Jiménez, F. G. Carmona, *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33 (1996).
- 3) K. Yamada, A. Akiba, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823 (2005).
- 4) M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, in press.