

ポリフェノールオキシダーゼによるビスフェノール A のキノン酸化とその除去

日大生産工(院) ○マハサロ カノックワン
日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

エポキシ樹脂やポリカーボネート樹脂の合成原料として使われているビスフェノール A(BPA)は内分泌かく乱懸念物質の一つであり、人体や動物に対してエストロゲン作用のあることが報告されている。BPA は工場からの流出液中に含まれることがあり、埋立地やゴミ廃棄場からの浸出液も発生源の一つである。BPA の分解や除去法として吸着や光分解などの化学的手法が報告されているが、近年フェノール化合物の転移を特異的に触媒化する酵素の利用が注目されている。BPA を処理する際に最も多く使われている酵素はペルオキシダーゼであり、過酸化水素(H_2O_2)存在下で BPA をフェノキシラジカルに転化し、水に不溶なオリゴマーを形成する。さらに、我々は H_2O_2 存在下でチロシナーゼによって BPA をキノン酸化させ、キトサンビーズへのキノン吸着によって効果的に BPA を除去できることを報告した¹⁾。

本研究では酸化還元酵素の一種であるポリフェノールオキシダーゼ(PPO)による BPA のキノン酸化と形成したキノン誘導体のキトサンビーズへのキノン吸着による BPA の除去について、PPO による BPA のキノン酸化における pH、温度、酵素濃度依存性を評価し、続いて BPA を除去するためのキトサンビーズの添加の効果を検討した。

【実験】

＜試料および溶液調製＞

PPO は、Worthington Biochemical(社)製のマッシュルーム由来のものを購入し、その比活性は $820\text{U}/\text{cm}^3$ であった。pH の異なるリン酸

緩衝溶液を用いて 0.35mM の BPA 溶液と $1000\text{ U}/\text{cm}^3$ の PPO 溶液を調製した。キトサンビーズ(富士紡績(株))、粒径： $70\sim 200\mu\text{m}$ 、比表面積： $70\sim 100\text{m}^2/\text{g}$)を購入し、緩衝溶液中に保存した。

＜PPO による BPA のキノン酸化＞

BPA 溶液 35cm^3 にリン酸緩衝溶液 1.0cm^3 と PPO 溶液 4.0cm^3 を加えることで酵素反応を開始させた。所定時間ごとに溶液を採取し、波長 383nm での吸光度を測定することによって酵素反応によるキノン酸化を評価した。特に記載がない限り、 $\text{pH}7.0$ 、 40°C において $[\text{BPA}]=0.3\text{mM}$ 、 $[\text{PPO}]=100\text{U}/\text{cm}^3$ で実験を行った。さらに、反応溶液中に所定量のキトサンビーズを加え、キトサンビーズへのキノン吸着の効果を検討した。

＜HPLC 法による転化率の測定＞

所定時間ごとに採取した溶液約 0.4cm^3 を約 80°C の温水に浸し、酵素を失活させた。マイクロシリンジでその溶液 20mm^3 を HPLC((株)日立製作所製 L-7000 シリーズ)へ注入した。カラムは GLサイエンス(株)製の Intertsil ODS-3 ($5\mu\text{m}$, $4.6\text{mm}\times 150\text{mm}$)を用い、 $45\text{vol}\%$ のアセトニトリル水溶液を流速 $1.0\text{cm}^3/\text{min}$ で送液した。保持時間 7.1 分での BPA のピーク面積と 0.3mM の BPA 溶液のピーク面積から転化率を求めた^{2,3)}。

【結果および考察】

BPA 溶液に PPO を加えると H_2O_2 不在下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、PPO 濃度を $100\text{U}/\text{cm}^3$ として PPO による BPA のキノン酸化の pH と温度

Quinone oxidation of bisphenol A with polyphenol oxidase and its removal

Kanokwan MAHASARO, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA,
and Kozunori YAMADA

依存性を評価した。図1に示すようにPPOはpH6.5~10の範囲で高い活性を示し、特にpH7.0では他のpHに比べて長い時間波長383nmの吸光度が上昇し続け、酵素活性が保持されたので、7.0を至適pHとした。BPAのキノン酸化の温度依存性を評価した結果、転化率は温度とともに上昇し、40°Cで最大となったので、40°Cを至適温度とした。また、BPAのキノンへの転化率は100U/cm³までは酵素濃度に比例したが、それ以上の濃度では上昇が緩やかになったので、100U/cm³を至適酵素濃度とし、このときの転化率は85.7%であった。以上の結果から、マッシュルームチロシナーゼ(200U/cm³)がH₂O₂存在下でBPAをキノン酸化させるのに対し、PPOはH₂O₂不在下でかつチロシナーゼよりも低い酵素濃度でBPAをキノン酸化できることが明らかとなった。

PPOの酵素反応によってH₂O₂不在下でBPAをキノン酸化できることが明らかとなったので、キトサンビーズを加えた際のキノン吸着による除去を検討した。PPOを含むBPA溶液にキトサンビーズを加えると、図2に示すように酵素反応によって形成したキノンがキトサンビーズに吸着するので、吸光度の上昇が抑えられた。キノン吸着による吸光度の低下はキトサンビーズ量が多いほど顕著であり、キトサンビーズ量0.05cm³/cm³

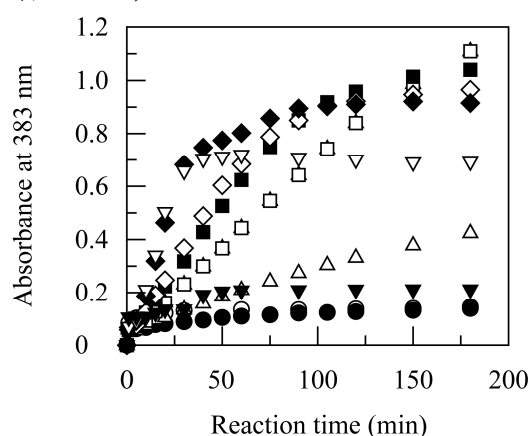


Figure 1 Changes in the absorbance at 383 nm with the reaction time for BPA (0.3mM) solutions containing PPO of 100 U/cm³ in pH 4.0 (○), 5.0 (●), 6.0 (△), 6.5 (▲), 7.0 (□), 7.5 (■), 8.0 (◇), 9.0 (◆), 10.0 (▽), and 11.0 (▼) buffers at 40°C.

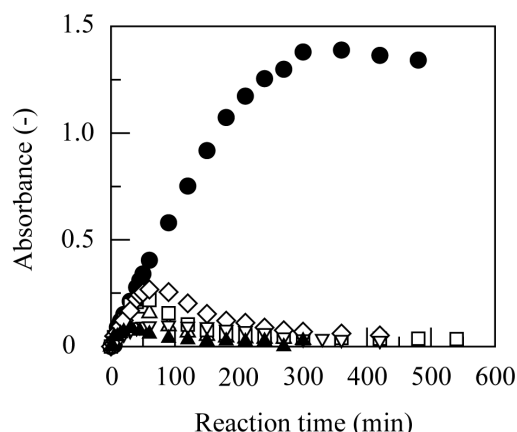


Figure 2 Changes in the absorbance at 383 nm with the reaction time for BPA (0.3mM) solutions containing polyphenol oxidase of 100 U/cm³ in the absence (●) and the presence of chitosan beads of 0.200 (▲), 0.150 (▽), 0.10 (△), 0.0500 (□), and 0.0250 (◇) cm³/cm³ at pH 7.0 and 40°C.

では反応時間7時間で転化率がほぼ100%に達した。さらにキトサンビーズ量を増加させるとより短時間でBPAがキノン酸化され、キトサンビーズ量0.10cm³/cm³では5時間でBPAをほぼ完全に除去することができた。

以上の結果から、PPOがH₂O₂不在下でBPAを効果的にキノン酸化でき、BPAをキノン酸化させる際の至適条件をpH7.0、温度40°C、酵素濃度100U/cm³と決定できた。さらに反応溶液中にキトサンビーズを加えることで酵素反応によって形成したキノンを吸着し、キトサンビーズ量0.05cm³/cm³以上においてBPAをほぼ完全に除去することができた。今後はBPAと構造が類似し、内分泌かく乱作用があるとされる種々のビスフェノール誘導体の除去を行う予定である。

【参考文献】

- 1) M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, in press.
- 2) K. Yamada, Y. Akiba, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823-829 (2005).
- 3) 杉山立樹, 武蔵絵里子, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 山田和典, 高分子論文集, **65**, 108-111 (2008).