5-64

麹菌チロシナーゼによるビスフェノール誘導体のキノン酸化とキトサンビーズへの吸着による除去

日大生産工(院)　○互　豪
日大生産工　柏田　歩・松田　清美・山田　和典
月桂冠㈱総研　秦　洋二・塩田　和功

【緒論】

難燃剤やパソコンの部品に使用されている特殊エポキシやポリカーボネート樹脂の原料であるビスフェノール誘導体はビスフェノールA(BPA)と構造が類似することから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ヒト発癌性物質，突然変異誘発物質，催奇形物質として作用する可能性がある．また，高温下や水蒸気との接触により特殊樹脂から分解溶出が起こるため，ビスフェノール誘導体のエストロゲン様作用により生態系への悪影響が懸念されている．

ビスフェノール誘導体を除去する方法として活性炭吸着法，活性汚泥法やオゾン酸化法などがあるが，より低コストで簡易な方法として酵素反応を利用した除去法に注目した．これまでに酸化還元酵素のマッシュルームチロシナーゼや大豆と西洋わさび由来のペルオキシターゼを用いたBPAおよびビスフェノール誘導体のキノン酸化について報告されている．また，酸化還元酵素の一種である麹菌由来のチロシナーゼは種々のアルキルフェノールをキノン酸化することができ，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除去することができる[1]．しかし，麹菌チロシナーゼによるビスフェノール誘導体の処理に関する報告例がないことから本研究では麹菌チロシナーゼによってビスフェノール誘導体をキノン酸化させる際の至適pH，温度および酵素濃度を転化率に対する挙動から決定した後，キトサンビーズへのキノン吸着による水溶液中からのビスフェノール誘導体の除去を検討した．

【実験】

<試料および溶液調整>

本研究では月桂冠㈱より提供された麹菌由来のチロシナーゼを使用し，その比活性は342U/mgであった．リン酸緩衝溶液(0.01M)を用いてビスフェノール誘導体およびチロシナーゼ溶液を調製した．キトサンビーズ(粒径：70～200μm，比表面積：70～100m^2/g)は富士紡績㈱から購入し，緩衝溶液中に保存した．ビスフェノール誘導体は市販品のものをそのまま使用した．

<酵素反応によるキノン酸化>

BPE 溶液に麹菌チロシナーゼを加え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．pH，温度，酵素濃度などの諸条件を変化させて BPE 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ビスフェノール誘導体に対して行った．

<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 20mm^3 を HPLC へ注入した．GL サイエンス㈱製の Inertsil ODS-3 カラムを用いてアセトニトリル水溶液を流速 1.0cm^3/min で送液し，保持時間 7～8 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 BPE と同様に転化率を求めた．

【結果および考察】

BPE のキノン酸化における pH と温度の至適条件を検討した結果から 6.0 と 30°C で実験を行なった．酵素濃度 100U/cm^3 におけるキノン酸化を他のビスフェノール誘導体に応用した結果を表１にまとめた．表１に示すようにビスフェノール C(BPC)，BPE，ビスフェノール F(BPF)，ビスフェノール O(BPO), ビスフェノール S(BPS)とビスフェノール T(BPT)はキノン酸化され，転化率は反応時間と共に上昇した．ペルオキシダーゼやマッシュルームチロシナーゼによる酵素反応を用いてビスフェノール誘導体を処理するには過酸化水素(H_2O_2)の添加が必要であったが，上述した麹菌チロシナーゼでは H_2O_2 不在下で効果的にビスフェノール誘導体のキノン酸化が進行した．H_2O_2 の残存は環境上好ましくないので，H_2O_2 不在下でキノン酸化が進行するのは特記すべきことである．ビスフェノール誘導体の中で BPE，BPF および BPO は高い転化率を示すことから酵素濃度 100U/cm^3 での転化率に対する挙動からキ

Quinone oxidation of bisphenol derivatives by *Aspergillus oryzae* tyrosinase and their removal through adsorption on chitosan beads

Suguru TAGAI, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA, Kazunori YAMADA, Youzi HATA and Kazunori SHIOTA

ノン酸化における酵素濃度を決定した．BPE と BPF は酵素反応速度が速く，処理時間が短いことから酵素濃度を BPE で 40U/cm^3，BPF で 60U/cm^3 まで低下させた．一方 BPO は酵素反応速度が遅く，処理時間が長いことから酵素濃度を 300 U/cm^3 まで上昇させた．

Table 1 Tyrosinase-catalyzed quinone oxidation of bisphenol derivatives at pH 6.0 and 30°C.

Bisphenol derivatives	Initial conc. (mM)	Tyrosinase conc. (U/cm^3)	Conversion %	Conversion time (hr)
bisphenol A (BPA)	0.30	100	no reaction	
bisphenol B (BPB)	0.30	100	no reaction	
bisphenol C (BPC)	0.05	100	26.6	3
bisphenol E (BPE)	0.30	100	100	2
bisphenol F (BPF)	0.30	100	97.3	5
bisphenol O (BPO)	0.30	100	33.7	5
bisphenol S (BPS)	0.30	100	8.6	3
bisphenol T (BPT)	0.30	100	7.4	3
bisphenol Z (BPZ)	0.05	100	no reaction	

次に pH6.0，30°C の酵素反応条件においてキトサンビーズの添加におけるキノン吸着による除去を BPE, BPF と BPO に対して検討した．BPE を対象にキトサンビーズの添加による吸光度と転化率の変化を図１に示す．キトサンビーズの存在下でチロシナーゼを添加すると添加しないときに比べ BPE のキノン誘導体への転化率は上昇し，キノン形成を示す波長の吸光度の上昇は抑えられた．これは酵素反応により形成されたキノンがキトサンビーズへ化学的に吸着することで溶液中のキノン濃度が低下し，反応速度が上昇したことを示す[2]．また，形成したキノンによる酵素反応の阻害をキトサンビーズとの吸着により減少させたことでキノン酸化が進行したと考えられる．反応時間３時間において転化率が 100%を示したことから溶液中の BPE がキノン酸化されてキノン誘導体となり，BPE が残存していないとみなすことができる．また，吸光度が０を示したことから酵素反応により形成したキノン誘導体が溶液中に残存せずにキトサンビーズと効果的にキノン吸着が起こったと考えられる．よって BPE を完全に除去できたといえることから環境負荷が低い本方法の除去が効果的であることがわかった．

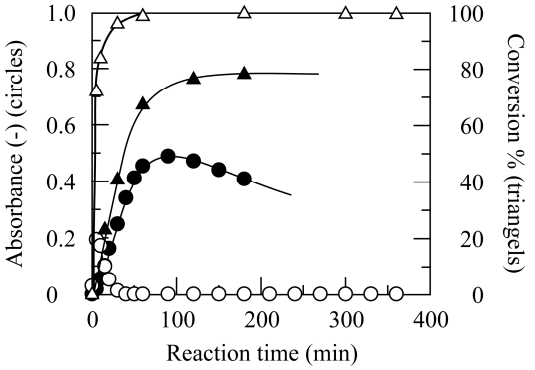

Figure 1 Removal of BPE through tyrosinase-catalyzed quinone oxidation and quinone-adsorption on chitosan beads in the absence (●, ▲) and presence of chitosan beads of 0.20 (○, △) cm^3/cm^3 at pH 6.0 and 30°C.

さらに BPF と BPO の除去における結果を表２にまとめた．BPF は酵素反応により水に可溶なキノンだけでなく水に不溶なキノンオリゴマーも形成した．キノンオリゴマーはろ過により除去できることから水に可溶なキノンをキトサンビーズに吸着させることで除去でき，表２に示すように酵素濃度 60U/cm^3 で完全に除去できた．また BPO は BPE と BPF に比べ酵素反応速度が遅いことから酵素反応を阻害するキノンを吸着するためにキトサンビーズ量 0.20cm^3/cm^3 に増加させることで完全に除去できた．

Table 2 Removal of BPE, BPF, and BPO by the combined use of quinone oxidation and subsequent quinone adsorption on chitosan beads pH 6.0 and 30°C.

Bisphenol derivatives	Tyrosinase conc. (U/cm^3)	Chitosan beads (cm^3/cm^3)	Removal %	Removal time (hr)
bisphenol E	40	0.10	97.9	3
(BPE)	40	0.20	100	3
bisphenol F	40	0.10	99.0	5
(BPF)	60	0.10	100	3
bisphenol O	300	0.10	99.6	6
(BPO)	300	0.20	100	6

これらのことから酵素濃度やキトサンビーズ量を変化させることで効果的に除去できることからキノンへの転化率が低いビスフェノール誘導体に対して今後検討する．その上で至適 pH と至適温度を検討し，除去率の向上を目指す．

【結論】

麹菌チロシナーゼによって BPE をキノン酸化させる際の至適 pH と温度はそれぞれ 6.0 と 30°C となり，この条件を他のビスフェノール誘導体にも応用した結果，BPC，BPE，BPF，BPO，BPS および BPT に効果的であることがわかった．特に H_2O_2 不在下で麹菌チロシナーゼによるビスフェノール誘導体のキノン酸化が進行することはペルオキシダーゼやマッシュルームチロシナーゼにはない特徴である．高い転化率を示した BPE, BPF と BPO に対しては至適酵素濃度を検討し，それぞれ 40U/cm^3, 60U/cm^3 と 300U/cm^3 となった．さらにキトサンビーズを添加することで酵素の反応性が高まり，キノン吸着により溶液中から BPE，BPF および BPO を完全に除去できた．

【参考文献】

[1] K. Yamada, T. Tamura, Y. Azaki, A. Kashiwada, Y. Hata, K. Higashida, Y. Nakamura., *J. Polym. Environ.,* **17**, 95 (2009).

[2] M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci*., **118**, 721 (2010).