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における 至適条件の決定とキトサンを利用した除去

日大生産工(院) 〇互 豪月桂冠(株)総研 秦 洋二・塩田 和功日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

# 【緒論】

パソコン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2つのフェノール基を持ち,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懸念されている.特殊樹脂 の分解や溶出によって環境中に流出すると生体 内に取り込まれることで発癌,突然変異などを 引き起こし,生態系への影響が考えられる.

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、オゾン酸化法などの化学的処理 法や活性汚泥法などの生物的処理法などが用い られるが、より短時間で高効率な方法として酵 素反応を利用した除去に注目した。これまで酸 化還元酵素の一種であるチロシナーゼやペルオ 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, 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 素反応により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<sup>1)</sup>. 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少なく, 同種の酵 素でも由来が異なれば基質特異性が異なること 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 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ビスフェノール誘導 体の除去を検討し、キトサンの形体の違いによ るビスフェノール誘導体の除去を比較した.

#### 【実験】

#### <試料および溶液調整>

本研究では月桂冠(株)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 342 U/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:70~200 µm, 比表面積:70~100m<sup>2</sup>/g)は富士紡績(株)から購入 し,緩衝溶液中に保存した.ビスフェノール誘 導体は市販品をそのまま使用した. <酵素反応によるキノン酸化>

ビスフェノール誘導体溶液に麹菌チロシナー ゼを加えて酵素反応を開始させ,所定時間ごと に反応溶液の UV-visible スペクトル(190~600 nm)を測定した.pH,温度,酵素濃度の諸条件を 変化させてビスフェノール誘導体のキノン酸化 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行った.

<HPLC 法による転化率の測定>

所定時間ごとに反応溶液から採取した溶液を 80℃の恒温槽中に数分間浸して酵素の活性を失 活させた後,マイクロシリンジで溶液 20mm<sup>3</sup>を HPLCへ注入した.GLサイエンス(株)製の Inertsil ODS-3 カラムを用いてアセトニトリル水溶液を 流速 1.0cm<sup>3</sup>/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.

#### 【結果および考察】

pH6.0, 30°C と酵素濃度 100U/cm<sup>3</sup>で種々のビ スフェノール誘導体のキノン酸化における結果 を表1にまとめた. ビスフェノール C(BPC), ビ スフェノール E(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)は麹菌チロシナーゼに よって pH6.0, 30°C でキノン酸化され,転化率 は反応時間とともに上昇した. ペルオキシダー ゼやマッシュルームチロシナーゼによりビスフ ェノール誘導体を処理するには過酸化水素 (H2O2)の添加が必要であったが,麹菌チロシナー ゼでは H2O2 不在下で効果的にキノン酸化が進行 した. ビスフェノール誘導体の中で BPE, BPF Table1 Tyrosinase -catalyzed quinoneoxidationof

bisphenolderivativesatpH6.0and30°C.

	Initial	Tyrosinase		Conversion
Bisphenol derivatives	conc.	conc.	Conversion %	time
	(mM)	(U/cm <sup>3</sup> )		(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)	0.02	100	no reaction	

Determination of Optimum Conditions for Quinone Oxidation of Bisphenol D erivatives by Aspergillusoryzae Tyrosinase and Their Removal with Chitosan

SuguruTAGAI,AyumiKASHIWADA,KiyomiMATSUDA,Kazu noriYAMADA, YoujiHATAandKazunoriSHIOTA および BPO は高い転化率を示すことからキノン 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<sup>3</sup>, BPF で 30U/cm<sup>3</sup> まで低下できた.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<sup>3</sup>まで上昇させた.

次に pH6.0, 30℃ で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 を添加すると不在下に比べ 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<sup>2)</sup>. さらに形 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%,吸光度がゼロを示した 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、キトサンビーズと効果的にキ ノン吸着が起こることで BPE を完全に除去でき たといえる. また, キトサン溶液とチロシナー ゼを加えた均一溶液系やキトサン粉末(平均粒 径:70~100µm)を分散させた不均一系では、キ トサンビーズを用いたほどの除去率が得られな かったことから、不均一系でのキトサンビーズ への吸着と高い比表面積が除去率の向上に必要 であることがわかり,本方法は短時間かつ高効 率であることが明らかになった.

BPF と BPO の除去における結果を表 2 にまと めた. BPF は表 2 に示すように酵素濃度 30U/cm<sup>3</sup> で完全に除去でき,さらに至適条件である pH5.0 と 35℃ では除去に必要な酵素濃度を 15U/cm<sup>3</sup>ま で減少できた.また BPO は BPE と BPF に比べ



**Figure 1** Removal of BPE through tyrosinasecatalyzed quinone oxidation and quinone adsorption on chitosan beads in the absence  $(\bigcirc, \bigtriangleup)$  and presence of chitosan beads of 0.20 $(\bigcirc, \bigtriangleup)$  cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> atpH6.0 and 30 °C.

**Table 2** Removal of BPE, BPF, and BPO by the<br/>combined use of quinone oxidation and subsequent<br/>quinone adsorption on chitosan beads at pH 6.0 and<br/> $30^{\circ}C$ 

Bisphenol derivatives	Tyrosinase conc. (U/cm <sup>3</sup> )	Chitosan beads (cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup> )	Removal %	Removal time (hr)
BPE	40	0.10	97.9	3
	40	0.20	100	2.5
BPF	20	0.10	74.0	5
	30	0.10	100	2/3
BPO	300	0.10	99.6	6
	300	0.20	100	6

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<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> に増加させることで完全に除去でき た. 今後, BPO に対しても至適 pH と温度を個別 に検討することで完全除去に必要な酵素濃度を 減少させる予定である.

## 【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℃ 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 H2O2 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<sup>3</sup>, 30U/cm<sup>3</sup> と 300U/cm<sup>3</sup> 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 を完全に除去できること を明らかにした.また,形成したキノンが化学 吸着し、キノンの濃度低下によりキノン酸化が 促進される不均一系での処理が、キトサン溶液 を用いた均一系での処理よりも短時間で効果的 に処理できた. さらに不均一系での除去では多 孔質で比表面積の大きいキトサンビーズを用い る本方法が BPE を除去するのに最も有用である ことが明らかになった. 今後, BPC, BPO, BPS と BPT に対して至適条件を決定することで除去 時間の短縮と除去効率の向上を検討する予定で ある.

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