

麹菌チロシナーゼによるビスフェノール化合物のキノン酸化と キトサンビーズへのキノン吸着による吸着除去

日大生産工(院) ○辻 良平

日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

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化合物は2つのフェノール基を有し、ビスフェノール A (BPA)と構造が類似しているため、その一部は内分泌かく乱作用が懸念されている。廃棄された樹脂製品の分解や溶出によって環境中に流出し、また生体内に取り込まれることによって発癌や突然変異などを引き起こす可能性がある。

ビスフェノール化合物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学的処理法などが用いられているが、より短時間で効率的な方法として酵素反応を利用した除去に着目した。これまで酸化還元酵素の一種であるマッシュルームチロシナーゼによる BPA やビスフェノール化合物のキノン酸化について報告されているが、麹菌由来のチロシナーゼを用いた報告例は少ない。さらに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¹⁾。同種の酵素でも由来によって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化合物をキノン酸化させる際の至適条件を決定し、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化合物の吸着除去を検討した。

【実験】

<試料および溶液調製>

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(0.01 M)を溶媒としてビスフェノール化合物と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: 70~100 m^2/g)は富士紡績(株)から購入し、緩衝溶液中に保存した。ビスフェノール化合物は東京化成工業(株)から購入した。

<酵素反応によるキノン酸化>

ビスフェノール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, 酵素濃度などの条件を変化させて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て除去実験を行った。

また、所定時間ごとに反応溶液から溶液を 0.5 cm^3 を採取し、80°C で加熱することで酵素を失活させた。そして、この溶液 20 mm^3 を HPLC へ注入し、Inertsil ODS-3 逆相カラムを用いてアセトニトリル水溶液を流速 1.0 cm^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。

【結果および考察】

これまでの研究で BPE を対象物質として麹菌チロシナーゼによるキノン酸化の至適条件は pH 6.0, 30°C で決定された。この至適条件で種々のビスフェノール化合物をキノン酸化させた際の結果を表 1 にまとめた²⁾。BPA, 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), ビスフェノール T (BPT)は pH 6.0, 30°C で麹菌チロシナーゼによってキノン酸化され、転化率は反応時間とともに上昇した。しかし、ビスフェノール B (BPB)とビスフェノール Z (BPZ)は、麹菌チロシナーゼではキノン酸化が確認されなかった。

また、マッシュルームチロシナーゼによるキノン酸化では過酸化水素の添加が必要であったが¹⁾、麹菌チロシナーゼでは過酸化水素を用いなくてもキノン酸化が進行した。

BPE の至適条件では BPA, BPT のキノン酸化

Table 1 *Aspergillus oryzae* tyrosinase-catalyzed quinone oxidation of various bisphenol compounds 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	200	31.1	32.0
bisphenol B (BPB)	0.30	100	no reaction	
bisphenol C (BPC)	0.05	100	26.6	3.0
bisphenol E (BPE)	0.30	100	100	2.0
bisphenol F (BPF)	0.30	100	100	5.0
bisphenol O (BPO)	0.30	100	32.4	5.0
bisphenol S (BPS)	0.30	100	8.6	3.0
bisphenol T (BPT)	0.30	100	7.4	3.0
bisphenol Z (BPZ)	0.02	100	no reaction	

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

Ryohei TSUJI, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA, and Kazunori YAMADA

が遅かったため、転化率の向上を目指した。また酵素反応の速度を高めるため、酵素濃度を 300 U/cm^3 まで上昇させた。BPA を異なる pH と温度でキノン酸化する際の経時変化をそれぞれ図 1 と 2 に示す。至適条件は 300 分での転化率の最大を示した pH, 温度である 8.0, 40°C と決定した。同様に BPT の至適条件を検討した結果, pH 6.0, 40°C と決定した。

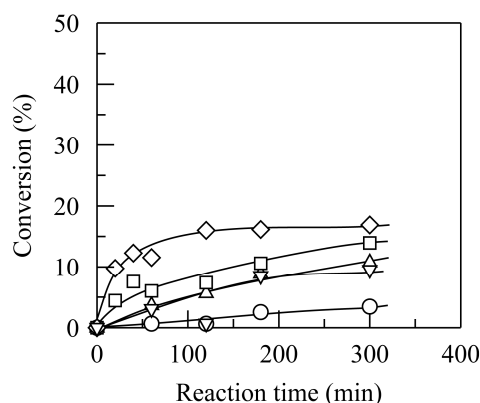


Figure 1 The time course of conversion for BPA (0.30 mM) solutions containing *Aspergillus oryzae* tyrosinase (200 U/cm^3) in buffers of pH 5.0 (○), 6.0 (△), 7.0 (□), 8.0 (◇), and 9.0 (▽) at 40°C

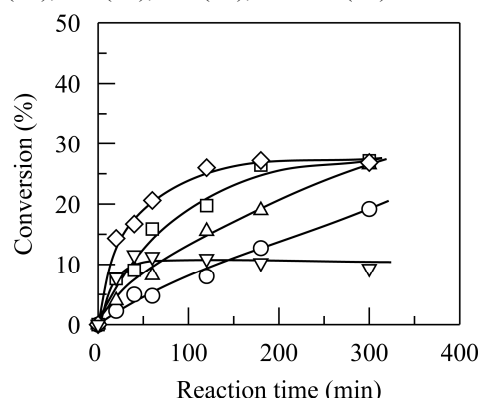


Figure 2 The time course of conversion for BPA (0.30 mM) solutions containing *Aspergillus oryzae* tyrosinase (300 U/cm^3) in a pH 8.0 buffers at 20 (○), 30 (△), 35 (□), 40 (◇), and 50 (▽) $^\circ\text{C}$

次に決定した至適条件で、キトサンビーズを $0.20 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ 添加し、形成したキノンの吸着による除去を検討した結果を図 3 に示す。

キトサンビーズを添加することで、酵素反応によって生成したキノンがキトサンビーズに吸着するため、溶液中のキノン濃度が減少し、キノンに帰属する吸光度はゼロとなった。また、溶液中のキノン濃度が低下することによって、キノンによる酵素の阻害が抑制されるため、キノンへの転化率はキトサンビーズ無添加のときと比べて上昇した。

BPA と BPT とともに基質濃度 0.30 mM では酵素濃度を 300 U/cm^3 まで上昇させたが、転化率はそれぞれ 32.2%と 41.7%にとどまったため、

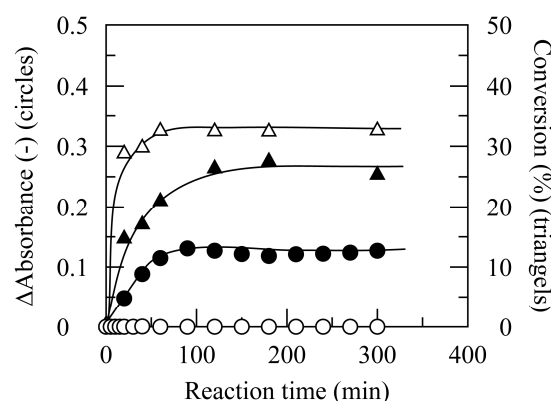


Figure 3 Removal of BPA through *Aspergillus oryzae* tyrosinase-catalyzed quinone oxidation and subsequent quinone adsorption on chitosan beads in the absence (●, ▲) and presence (○, △) of chitosan beads of $0.20 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ at pH 8.0 and 40°C

BPA と BPT の濃度を下げてキノン酸化を行った。BPA は基質濃度を下げても、転化率はほとんど変化しなかったが、BPT では 0.010 mM まで濃度を下げることで転化率が 100%となり、キノンに帰属する吸光度がゼロを示したことから完全除去できたと考えられる。

【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 6.0 と 30°C となり、この条件で、BPC, BPE, BPF, BPO, BPS および BPT も麹菌チロシナーゼによってキノン酸化できることがわかった。BPE と BPF では、キノン酸化とキノン吸着を併用して完全に除去できた。BPE での至適条件では BPA のキノン酸化の効率が低いため、BPA をキノン酸化させる際の至適条件を検討した結果, pH 8.0, 40°C となった。この条件でキトサンビーズを添加することによって酵素の反応性が高まり転化率が上昇した。また、BPT も同様にキノン酸化させる際の至適条件を検討したところ, pH 6.0, 40°C となった。さらに BPA と同様にキトサンビーズを添加することで転化率が上昇した。BPT 濃度が 0.010 mM では、キノン酸化とキノン吸着を併用して完全除去できた。

今後、BPE の至適条件で酵素反応が確認された BPC, BPS に対して至適条件を決定することで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).
- 2) 互 豪, 秦 洋二, 塩田 和功, 柏田 歩, 松田 清美, 山田 和典, 第 44 回日本大学生産工学部学術講演会応用分子化学部会, 5-4 (2011).