

酸化還元酵素のグラフト化ポリエチレン板への固定化と酵素活性の評価

日大生産工(院) ○坂井幸助

日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

【緒論】

ポリカーボネートやエポキシ樹脂などに使用されているビスフェノールA(BPA)は内分泌かく乱懸念物質であり、主に工業排水や缶詰のコーティング剤の溶出などから環境中に流出していると言われている。BPAを除去する方法として、近年酵素の利用が着目されている。酸化還元酵素の一つであるポリフェノールオキシダーゼ(PPO)は分子状酸素の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酵素である。我々はこれまでの研究でPPOによってBPAをキノン酸化させ、生成したキノンをキトサンのアミノ基へ結合させることで溶液中からBPAを効率よく除去できることを報告した¹⁾。しかし、酵素を溶解させて利用すると、酵素を利用した後、高い活性を保持した状態で酵素を反応溶液中から回収することが困難である。また、pH変化や熱、塩類などに対して不安定であるため、酵素を固定化して利用することはこれらの因子に対する安定性を向上させる点でも重要である。

本研究では固定化担体として、化学的に安定で強度がある低密度ポリエチレン(LDPE)板を使用し、カルボキシル基含有の親水性モノマーであるメタクリル酸(MAA)をグラフト重合した。MAAグラフト化LDPE (LDPE-g-PMAA)板に水溶性カルボジイミドを用いて共有結合を介してPPOの固定化を行った。

【実験】

<LDPE-g-PMAA板へPPOの固定化>

厚さ1.0mmのLDPE板にベンゾフェノン塗布した後、濃度1.0MのMAA水溶液に浸漬し、60°Cで高圧水銀灯からの紫外線を照射することでLDPE板にMAAを光グラフト重合した²⁾。

PPOはWorthington Biochemical社製のマッシュルーム由来のものを使用し、その比活性は845U/cm³であった。イオン強度0.01Mのリン酸緩衝溶液にPPOと1-シクロヘキシル3-(2-モルホリノエチルカルボジイミド)メト-p-トルエンサルホン酸塩(CMC)の混合溶液を調製し、[PPO]=0.2~0.5mg/cm³、[CMC]=1.0mg/cm³で変化させた。緩衝溶液に一晚浸漬したLDPE-g-PMAA板をこの混合溶液に浸し、24時間攪拌することで

LDPE-g-PMAA板にPPOを固定化した。固定化PPO量はビシンコニン酸法によって固定化前後のPPO溶液の吸光度差から検量線を用いて求め、単位面積あたりの固定化量(mg/cm²)として算出した。

<架橋キトサンゲルビーズの調製>

和光純薬工業(株)製のキトサン500を2.0wt%の酢酸溶液に溶解させることで約1%のキトサン溶液を調製した。ビュレットでこのキトサン溶液を1.0wt%のトリポリリン酸ナトリウム溶液中に滴下することでキトサンビーズを作製し、さらに1.0Mの水酸化ナトリウム水溶液中で攪拌しながら70~80°Cで加熱することで、架橋反応を進行させた。反応後架橋キトサンビーズは1.0Mの塩酸水溶液と水酸化ナトリウム水溶液で交互に洗浄した。

<固定化PPOによるBPAのキノン酸化とキトサンゲルビーズによるキノン吸着>

LDPE-g-PMAA板上のグラフト鎖にPPOの触媒作用によって形成したキノンが反応するという結果があるので³⁾、常に架橋キトサンビーズの存在下でキノン酸化を行った。0.30mMのBPA溶液にキトサンゲルビーズを分散させ、さらにPPOを固定化したLDPE-g-PMAA(PPO-i-LDPE-g-PMAA)板を浸漬させ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、約80°Cで酵素を熱失活させた後、マイクロシリレンジで溶液20mm³をHPLCへ注入した。カラムはGLサイエンス(社)製のInertsil ODS-3を用いて45vol%のアセトニトリル水溶液を流速1.0cm³/minで送液し、保持時間7.1分でのピーク面積から転化率を求めた。

【結果および考察】

native PPOのBPAのキノン酸化における至適条件はpH7.0、40°Cであり、市販の多孔質キトサンビーズを加えたときの除去率を表1にまとめた。キトサンビーズ存在下、PPO濃度キトサンビーズ存在下、PPO濃度75U/cm³でBPAを完全除去できた。また、PPO濃度やキトサンビーズ量を増加することで除去時間が短縮した。この結果から、PPOによるキノン酸化とキトサンビーズへのキノン吸着によって溶液中からBPAを除去できることがわかった。よって、

Immobilization of an oxidoreductase on grafted polyethylene plates and measurement enzymatic activity

Kousuke SAKAI, Ayumi KASHIWADA,
Kiyomi MATSUDA, and Kazunori YAMADA

Table 1 Removal of BPA through quinone oxidation by native PPO and subsequent quinone adsorption on chitosan beads at pH 7.0 and 40°C.

[PPO] (U/cm ³)	Initial velocity ^a (μM/min)	Amount of chitosan beads (cm ³ /cm ³)	Initial velocity ^b (μM/min)	Removal time (hr)	Removal (%)
100	1.36	0.025	2.01	7	98.7
		0.050	2.73	9	99.4
		0.10	3.35	5	100
		0.20	3.60	2.5	100
75	0.780	0.10	1.51	7	100
		0.15	1.58	5	100
50	0.338	0.10	1.11	5	68.5

^a The values of initial velocity of PPO-catalyzed quinone oxidation in the absence of chitosan beads.

^b The values of initial velocity of PPO-catalyzed quinone oxidation in the presence of chitosan beads.

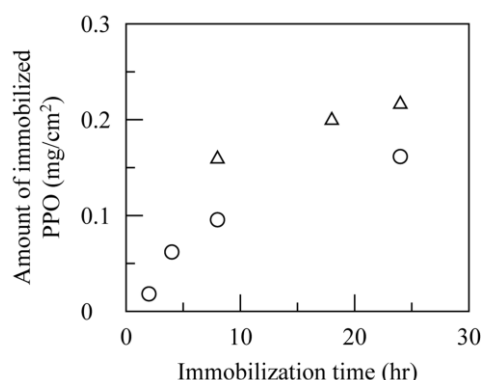


Figure 1 Changes in the amount of PPO immobilized onto a LDPE-g-PMAA plate of 195 μmol/cm² with the reaction time in a pH 6.0 buffer containing PPO (○: 0.2, △: 0.5 mg/cm³) and CMC (1.0 mg/cm³).

BPAをキノン酸化させる際のPPOの固定化による反復利用を目的とした固定化条件の検討を行った。まず、CMC存在下でもPPO濃度とビシンコニン酸法によって発色した溶液の吸光度の間に相関性の高い直線関係が得られた。グラフト量195μmol/cm²のLDPE-g-PMAA板をpH6.0でCMCを含むPPO溶液に浸漬し、4°Cで攪拌した際の固定化時間に対するPPO固定化量を図1に示す。LDPE-g-PMAA板へのPPO固定化量は固定化時間が長いほど、またPPO濃度が高いほど高くなった。

次にnative PPOの至適条件であるpH7.0, 40°Cで市販キトサンビーズ(膨潤状態での平均粒径: 70~200μm)とPPO-i-LDPE-g-PMAA板をBPA溶液に浸すことで、キノン吸着によるBPAの除去を検討したが、反応中にPPO-i-(LDPE-g-PMAA)板表面にキトサンビーズが付着し、取扱いが困難となったため、架橋キトサンビーズを作成した。この架橋キトサンビーズのpH7.0の平均粒径は約2.4mmであった。固定化PPOによるBPAのキノン酸化とキトサンビーズへのキノン吸着を検討した結果、図2に示すように反応時間10分でBPAの転化率が約17%となった。

また、キトサングルビーズが茶色に変色した

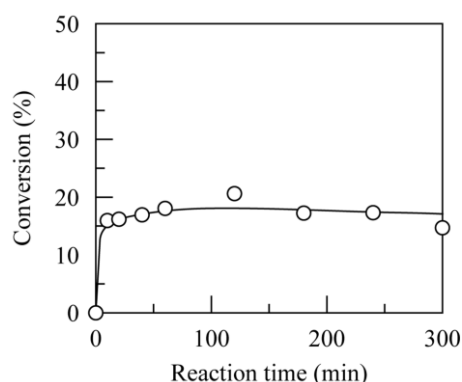


Figure 2 The time course of conversion value for BPA with a PPO-i-(LDPE-g-PMAA) plate in the presence of chitosan beads of 0.10 cm³/cm³ at pH 7.0 and 40°C.

Immobilized amount: 0.235 mg/cm²

ことからBPAから形成したキノンがキトサンビーズにキノン吸着したことがわかった。

【結論】

native PPOの至適条件はpH7.0, 40°Cであり、市販キトサンビーズを使ってBPAを完全に除去できるので、LDPE-g-PMAA板を用いてグラフト鎖にPPOを共有結合を介して固定化させた。PPO-i-(LDPE-g-PMAA)板と架橋キトサンビーズを併用することでBPAのキノン吸着が可能となったので、固定化時と活性測定時のpH依存性、温度、グラフト量、固定化量依存性などを検討する。

【参考文献】

- 1) Y. Kimura, M. Yamamoto, R. Shimazaki, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **124**, 796 (2012).
- 2) K. Yamada, S. Yamagami, Y. Naohara, *J. Appl. Polym. Sci.*, **125**, 2614 (2012).
- 3) K. Noto, S. Matsumoto, Y. Takahashi, M. Hirata, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **113**, 39, (2009).