

酸化還元酵素とキトサンによる水溶液からのビスフェノール誘導体の除去

日大生産工(院) ○辻 良平

日大生産工 木村 悠二・柏田 歩・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誘導体は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由来のチロシナーゼによる BPA や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よく反応するため、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誘導体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誘導体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340.2 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誘導体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。ビスフェノール誘導体は東京化成工業(株)から購入した。30%過酸化水素(H_2O_2)は和光純薬工業(株)から購入した。ポリエチレングリコール(PEG)はSIGMA 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誘導体をキノン酸化させた際の結果を表 1 にまとめた。ビスフェノール S (BPS)を除く他のビスフェノール誘導体は 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、BPS では、麹菌チロシナーゼによるキノン酸化は確認されなかった。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

Table 1 *Aspergillus oryzae* tyrosinase-catalyzed quinone oxidation of BPA and different bisphenol derivatives at pH 6.0 and 30°C.

bisphenol derivative	initial conc. (mM)	tyrosinase conc. (U/ cm^3)	reaction time (hr)	conversion %
bisphenol A (BPA)	0.30	200	24	31.1
bisphenol B (BPB)	0.30	300	24	21.7
bisphenol C (BPC)	0.05	100	3	26.6
bisphenol E (BPE)	0.30	100	2	100
bisphenol F (BPF)	0.30	100	5	100
bisphenol O (BPO)	0.30	100	5	32.4
bisphenol S (BPS)	0.30	100		no reaction
bisphenol T (BPT)	0.30	100	3	7.4
bisphenol Z (BPZ)	0.02	300	5	40.5

Removal of bisphenol derivatives from aqueous solutions
by combined use of an oxidoreductase and chitosan

Ryohei TSUJI, Yuji KIMURA, Ayumi KASHIWADA, and Kazunori YAMADA

Table 2 Optimal conditions of quinone oxidation of BPA and different bisphenol derivatives by *Aspergillus oryzae* tyrosinase.

bisphenol derivative	pH value (-)	temperature (°C)
bisphenol A (BPA)	8.0	40
bisphenol B (BPB)	7.0	30
bisphenol C (BPC)	6.0	30
bisphenol E (BPE)	6.0	30
bisphenol F (BPF)	5.0	35
bisphenol O (BPO)	6.0	20
bisphenol S (BPS)	6.0	30
bisphenol T (BPT)	6.0	40
bisphenol Z (BPZ)	9.0	30

キノン酸化が進行した。

BPE の至適条件では BPA, ビスフェノール B (BPB), ビスフェノール C (BPC), ビスフェノール T (BPT), ビスフェノール Z (BPZ) のキノン酸化が遅かったため, 転化率の向上を目指した。また, 酵素反応の速度を上げるため酵素濃度を 300 U/cm³ まで上昇させた。各ビスフェノール誘導体において検討した至適条件を表 2 に示す。

次に BPA において決定した至適条件で, キトサンビーズを 0.20 cm³/cm³ 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 1 に示す。溶液中にキトサンビーズを分散させることで, 酵素反応によって生成したキノンがキトサンビーズに速やかに吸着するため, 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, BPB, BPC, BPT, および BPZ では, 酵素濃度を 300 U/cm³ まで上昇させたが, 転化率が 50% 未満にとどまったため, 基質濃度を下げてキノン酸化を行った。BPA は基質濃度を下

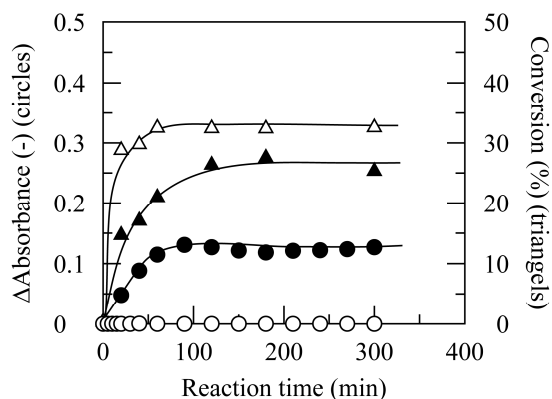


Figure 1 Removal of BPA through *Aspergillus oryzae* tyrosinase-catalyzed quinone oxidation and subsequent quinone adsorption on chitosan beads in the absence (●, ▲) and presence (○, △) of chitosan beads of 0.20 cm³/cm³ at pH 8.0 and 40°C.

げても, 転化率はほとんど変化しなかったが, BPT と BPZ は基質濃度を 0.010 mM まで下げることで転化率が 100% に達し, キノンに帰属する吸光度がゼロを示したことから, 溶液中から完全除去できたと考えられる。

また, BPA は低濃度でも完全除去できなかったため, 酵素の活性を保持する働きをもつ PEG) マッシュルームチロシナーゼによるキノン酸化に必要な H₂O₂ を添加し²⁾, その至適条件を検討することで転化率の向上を目指した。その結果, PEG は, 分子量 10000 g/mol, 濃度 0.10 mg/cm³, H₂O₂ は, 0.50 mM と至適条件を決定した。そして, PEG, H₂O₂ 無添加のものに比べて, H₂O₂ を添加することによって, 転化率を向上することができた。しかし, PEG を添加した場合の転化率の顕著な向上は確認されなかった。

【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, BPS を除く他のビスフェノール誘導体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, 同様に各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。さら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 と BPZ は, 基質濃度 0.010 mM においてキノン酸化とキノン吸着を併用して完全除去できた。

BPA に対して, 至適条件の PEG, H₂O₂ を加えることで更なる転化率の向上が見られた。しかし, PEG の影響は小さいため, 本研究においては添加しないことを決定した。

今後は, 決定した至適条件の H₂O₂ 濃度において, キトサンビーズを添加し除去率の検討を行い, BPA の完全除去を目指す。

【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)