

ポリフェノールオキシダーゼによるビスフェノールAとその誘導体の処理と酵素の固定化

日大生産工(院) ○坂井幸助

日大生産工 木村 悠二・柏田 歩・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)とその誘導体は内分泌かく乱懸念物質であり、主に産業廃棄物の浸出液や製品材料から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とその誘導体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、化学的に安定である陽イオン交換樹脂を使用し、樹脂のカルボキシル基と酵素のアミノ基を水溶性カルボジイミドを介して共有結合でPPOの固定化を行い、固定化PPOの再利用性を検討した。

【実験】

<陽イオン交換樹脂へPPOの固定化>

PPOを固定化させる不溶性担体として三菱化学(社)製の粒径分布300~1180 μm 、交換容量2.5 meq/cm³、含水率53~59%のメタクリル系陽イオン交換樹脂を使用した。PPOはWorthington Biochemical社製のマッシュルーム由来のものを使用し、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-トルエンスルホン酸塩(CMC)の混合溶液を調製し、そのときの濃度は[PPO]=0.5mg/cm³、[CMC]=1.0mg/cm³であった。緩衝溶液に一晩浸漬した陽イオン交換樹脂をこの混合溶液に浸し、所定時間攪拌することで樹脂に

PPOを固定化した。固定化した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、樹脂量あたりの固定化量(mg/cm³-resin)として算出した。

<固定化PPOによるBPEのキノン酸化とキトサンビーズによるキノン吸着>

陽イオン交換樹脂へ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り、通常のバッチ式ではキノンが滞留してしまうため、溶液を循環させることで樹脂へのキノン吸着を防ぐようにした²⁾。また、BPAよりキノン酸化を受けやすいBPEを対象基質として固定化PPOの酵素活性を評価した。0.10mMのBPE溶液中にキトサンビーズを分散させた。また、BPE溶液の上部にPPOを固定化した陽イオン交換樹脂をカラムに充填し、BPE溶液をカラムへ流入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。その後、UV-visibleスペクトルでキノンの形成を確認し、マイクロシリッジで溶液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6分でのピーク面積から転化率を求めた。

【結果および考察】

free PPOによるBPAとその誘導体のキノン酸化における至適条件を個別に検討し、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濃度を変えることでBPAとその誘導体を完全除去でき、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。また、BPF、BPE、BPA、BPBの順で高濃度のPPOを必要としたことから、フェノール基間の炭素数が長いほど高いPPO濃度を必要とした。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、BPAよりキノン酸化を受けやすいBPEを基質として、固定化PPOの活性を測定し、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

Treatment of bisphenol A and its derivatives by polyphenol oxidase
and immobilization of an enzyme

Kousuke SAKAI, Yuji KIMURA, Ayumi KASHIWADA, and Kazunori YAMADA

Table 1 Removal of BPA and its derivatives through quinone oxidation by free PPO and subsequent quinone adsorption on chitosan beads.

bisphenol derivative	init. conc. (mM)	pH value (-)	temperature (°C)	[PPO] (U/cm ³)	chitosan beads (cm ³ /cm ³)	removal time (hr)	removal (%)
BPA	0.30	7.0	40	100	0.05	7	100
					0.10	5	100
					0.20	4	100
BPB	0.30	7.0	40	100	0.10	5	93.0
					0.20	5	100
				150	0.10	3	100
BPC	0.05	7.0	30	300	0.10	8	88.8
	0.03				0.10	8	95.5
					0.20	9	100
BPE	0.30	7.0	40	10	0.10	5	100
				20	0.10	1	100
BPF	0.30	7.0	30	4	0.10	3	100
				6	0.10	1.5	100
BPO	0.30	7.0	40	50	0.10	2	100
				100	0.10	0.5	100
BPT	0.30	8.0	40	100	0.10	5	89.3
				125	0.10	1.5	100
BPZ	0.02	7.0	40	20	0.10	5	89.5
				40	0.10	5	100

下でもPPO濃度とビス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。陽イオン交換樹脂量1.0cm³をpH6.0でCMCを含むPPO溶液に浸漬し、4°Cで攪拌した。その結果、反応時間とともにPPO固定化量は増加したことから、陽イオン交換樹脂へPPOを水溶性カルボジイミドを介して共有結合で固定化できることがわかった。

次にfree PPOの至適条件であるpH7.0、40°Cでキトサンビーズ(膨潤状態での平均粒径：70～200μm)を分散させたBPE溶液をカラムに充填したPPO固定化量4.818mg/cm³-resinの陽イオン交換樹脂へ流入することでキノン酸化を開始した。反応時間とともにBPEの転化率は上昇したが、複数回測定を行うと転化率は徐々に低下した。これは酵素反応によって生成したキノンが陽イオン交換樹脂に吸着したことでPPOの活性が低下したためと考えられる。

さらにPPO固定化量を変えることでBPEの除去の再利用性を行った結果を図1に示す。陽イオン交換樹脂へ固定化したPPO量が少ないほど比初速度が高くなった。これはPPO固定化量が高くなることで酵素の緻密化が起これ、BPEと酵素の活性部位との接触が低下したためと考えられる。

【結論】

free PPOによるBPAとその誘導体の至適条件を個別に決定し、キトサンビーズを用いて完全に除去できることがわかった。この結果より、

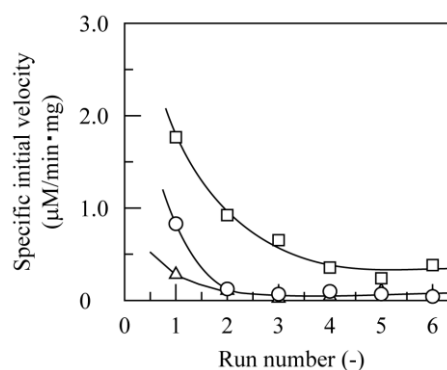


Figure 1 Changes in the specific initial velocity with the run number for removal of BPE by immobilized PPO (○: 4.818, △: 4.813, □: 1.698 mg/cm³-resin) in the presence of chitosan beads of 0.10 cm³/cm³ at pH 7.0 and 40°C.

陽イオン交換樹脂を用いてPPOを共有結合を介して固定化させた。PPO固定化陽イオン交換樹脂とキトサンビーズを併用することでBPEのキノン吸着が可能となったので、今後は固定化時と活性測定時のpH依存性や温度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) A. Tamura, E. Satoh, A. Kashiwada, K. Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **115**, 137, (2010).