ISSN 2186-5647

P-31

カワラタケラッカーゼによるビスフェノールAの処理における至適条件の決定

日大生産工(院)　○高橋あゆみ
日大生産工　木村悠二　柏田　歩　山田和典

【緒論】ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の製造原料であるビスフェノール A(BPA)には内分泌かく乱作用があることが懸念されており，生体内に取り込まれると発癌性や遺伝子異常や免疫機能抑制などが危惧される．これまでにオゾン酸化，活性炭吸着，光酸化などの化学的処理法による分解や除去に関する研究が報告されているが，処理速度が遅い，反応中間体や副生成物が残存するなどの問題があるので，短時間で効率的に処理する方法として酸化還元酵素の利用に着目した．多くの酵素は植物や果物などに由来し，生態環境に近い常温，中性付近で高い触媒効率を示すので，環境負荷が低いと考えられる．これまでに，ペルオキシダーゼやチロシナーゼによる BPA の処理に関する報告はあるが [1,2]，ラッカーゼを用いた報告は少ない．そこで，本研究では H_2O_2 不在下でフェノール化合物のラジカル化を触媒するラッカーゼによるBPAの除去を検討した．また，BPA をラッカーゼにより処理する際，ポリエチレングリコール(PEG)を添加すると酵素の活性を維持でき，BPA を効果的に除去できるという報告があるので [3]，PEG の添加による効果も検討した．

【実験】

＜試料および溶液調製＞

Sigma-Aldrich (株)からカワラタケ由来のラッカーゼを購入し，その比活性は 13.6U/mg であった．異なる pH のリン酸緩衝溶液(0.01M)を用いて，0.40mM の BPA 溶液，2.5U/cm^3 および 5.0U/cm^3 のラッカーゼ溶液，2.0mg/cm^3 の 10K-PEG 溶液を調製した. 0.25M の炭酸水素ナトリウム水溶液を溶媒として 20.8mM の 4-アミノアンチピリン(4-AA)溶液と 83.4mM のフェリシアン化カリウム溶液を調製した．

＜酵素による酸化カップリング反応＞

BPA 溶液にラッカーゼを加えることによって酵素反応を開始させ，所定時間ごとに 600nm における吸光度を測定し，濁度を計算した．pH，温度などの条件を変化させて BPA の酸化カップリング反応における至適条件を決定した．

＜4AA および HPLC 法による BPA の定量＞

所定時間ごとに採取した溶液からメンブレンフィルターユニットを用いて不溶性オリゴマーを除去した後，ろ液 0.7cm^3 を 100℃で処理し酵素を失活させ，4AA 法と HPLC 法によって BPA 濃度を求めた．ろ液 0.4 cm^3 に炭酸水素ナトリウム溶液 0.8 cm^3, 4AA 溶液 0.1 cm^3, フェリシアン化カリウム溶液 0.1 cm^3 を加えて発色後の吸光度を波長 505nm で測定した．また，HPLA 法では 45%アセトニトリル水溶液を流速 1.0cm^3/min で送液し，保持時間 6.9 分での波長 278nm でのピーク面積から転化率を求めた．

【結果および考察】BPA 溶液にラッカーゼを加えると，H_2O_2 不在であっても不溶性のオリゴマーが生成し溶液が白濁した．さらに，ポリエチレングリコール(PEG)を含む BPA 溶液にラッカーゼを加えると，溶液の濁度が急激に上昇したので，PEG 不在下と存在下の双方において pH および温度依存性を評価した．pH に対する反応時間 1 時間での BPA 残留濃度および転化率の変化を図 1 に示す．PEG 不在下では，pH7.0 で BPA の残留濃度が最も低くなったので，至適 pH は 7.0 と決定した．PEG を添加すると BPA の残留濃度は pH5.0 で最も低くなったので，至適 pH を 5.0 と決定し，PEG の有無により至適 pH が異なることがわかった．決定した至適 pH で温度依存性を評価した．温度に対する反応時間 1 時間での BPA 残留濃度および転化率の変化を図 2 に

Determination of the optimum conditions for treatment of bisphenol A by Trametes versicolor laccase.

Ayumi Takahashi, Yuji Kimura, Ayumi Kashiwada, Kazunori Yamada

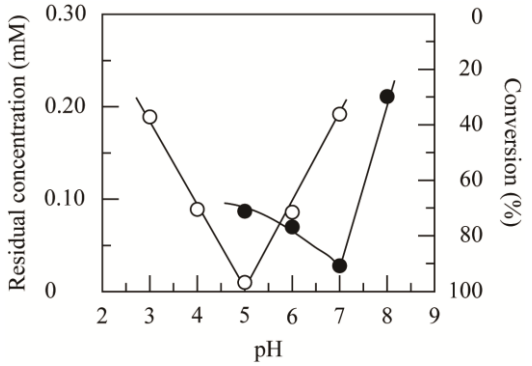

Figure 1 The effect of the pH value on laccase-catalyzed treatment of BPA at 40℃ without (●) and with (○) PEG.

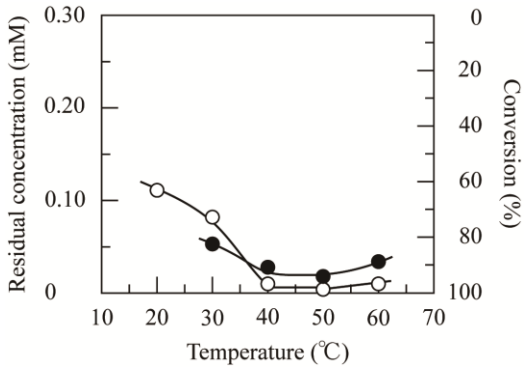

Figure 2 The effect of temperature on laccase-catalyzed treatment of BPA at pH 7.0 without PEG (●) and at pH 5.0 with PEG (○).

示す. PEG 不在下と存在下でそれぞれ 40℃と 50℃で BPA の残留濃度が最も低くなったので，より常温に近い 40℃を至適温度に決定した．さらに，pH5.0，40℃の至適条件下で BPA を処理する際の PEG 分子量依存性を評価した．PEG の分子量に対する BPA の残留濃度および転化率の変化を図 3 に示す．分子量が大きくなるにつれて残留濃度は低下し，4.6K および 10K で最も低くなったので, 至適 PEG

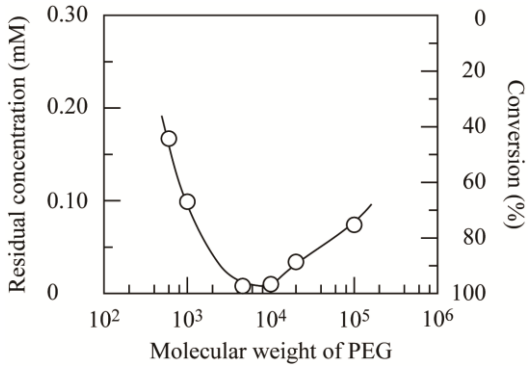

Figure 3 The effect of molecular weight of PEG on laccase-catalyzed treatment of BPA at pH 5.0 and 40℃.

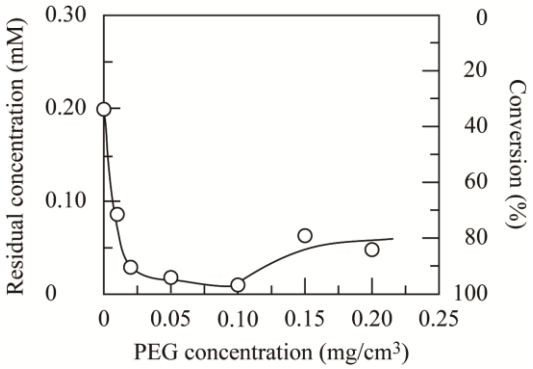

Figure 4 The effect of PEG concentration on laccase-catalyzed treatment of BPA at pH 5.0 and 40℃.

分子量を 4.6K～10K に決定し, PEG 濃度依存性を評価した．PEG 濃度に対する BPA の残留濃度および転化率の変化を図 4 に示す．PEG の濃度が高くなるにつれて残留濃度は低下し，0.10mg/cm^3 で最も低くなったので，至適 PEG 濃度を 0.10mg/cm^3 と決定した. PEG 不在下と存在下で決定した至適条件で酵素濃度依存性を評価した結果，PEG 不在下では 1.0U/cm^3 のラッカーゼによって反応時間 4 時間で, また PEG 存在下では 0.05 U/cm^3 のラッカーゼによって反応時間 1.5 時間で転化率が 100%に達し, PEG を添加することによって酵素濃度を 1/20 に低減することができ，処理時間を短縮することができた.

【結論】上記の結果から，カワラタケ由来のラッカーゼによる BPA の処理における至適条件は，PEG 不在下では pH7.0，40℃，PEG 存在下では pH5.0，40℃と決定でき，添加する PEG の分子量は 4.6K または 10K，濃度は 0.10mg/cm^3 が最適であることがわかった．また，PEG を添加することにより酵素活性の低下を抑制することができ，酵素濃度 0.05 U/cm^3 で 0.30mM の BPA を完全に処理できることが明らかとなった.

【参考文献】

1) M. Suzuki, T. Sugiyama, E. Musashi, Y. Kobiyama, A. Kashiwada, K, Matsuda, K. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **118**, 721 (2010).
2) K. Yamada, N. Ikeda, Y. Takano, A. Kashiwada, K, Matsuda, M. Hirata, *Environ. Technol.*, **31**, 243 (2010).
3) Y. J. Kim, J. A. Nicell, *Proc. Biochem.*, **41**, 1029-1037 (2006).