

水中パルス放電による可溶性タンパク質の分解

大嶋 孝之^{*1}, 堀野 太希^{*}, 柴田 義幸^{*}, 長谷川 優子^{*},
佐藤 正之^{*}

(2008年8月20日受付; 2008年12月15日受理)

Protein Decomposition by Pulsed Discharge Plasma in Water

Takayuki OHSHIMA,^{*1} Taiki HIRINO,^{*} Yoshiyuki SHIBATA,^{*}
Yuko HASEGAWA^{*} and Masayuki SATO^{*}

(Received August 20, 2008; Accepted December 15, 2008)

Domestic wastewaters from our home are one of the pollutants in our circumstance. These wastewaters consist of various organic compounds such as lipid, protein, and detergent, and these compounds should be decomposed in wastewater treatment. We have studied the generation of pulsed discharge plasma in water and some AOPs for wastewater treatment. In this study, we demonstrated the decomposition of soluble proteins by pulsed discharge plasma in water. The microbubbles generated by SPG (Shirasu Porous Glass) filter was introduced into the plasma reactor to facilitate the discharge plasma generation. When albumin solution (0.1 mg/mL) was used as the model protein, 90 % decomposition was achieved within the treatment time of 60 min with the applied voltage of 14 kV. We also tried to decompose milk protein with the same system. Although the significant decomposition of the proteins in non-diluted milk was not confirmed, apparent decomposition of milk protein in 250 times of dilution of sample milk was observed by SDS-PAGE analysis. The applied voltage, which affected the frequency of plasma generation, also influenced the decomposition ratio of milk proteins, and higher voltage resulted in the higher decomposition ratio. These results confirmed that the soluble protein could be decomposed by pulsed discharge plasma in water.

1. はじめに

水質汚染の主な原因物質は、有機物や窒素、リンなどの栄養塩類、その他カドミウム、有機水銀などの重金属や揮発性有機化合物 (VOC) などの物質である。産業排水、生活排水、自然排水からなるものだが、現在の水質汚染の原因の7割近くが生活排水によるものとされている。生活排水中には洗剤、油、汚れ成分等が含まれているが、タンパク性の汚れもその内の一つとされ、これらの除去により、生活排水による水質汚染の防止が期待される。

現在、有機化合物などを含む一般排水や生活排水は主に活性汚泥法 (生物処理) が用いられているが、有機塩素系化合物等、生物にとって難分解性の化学物質を多く含む排水などは、活性汚泥の機能障害を生じやすく、処理が困難である。さらに、活性汚泥法で処理されずに環境中に放出された化学物質により、新たな環境汚染や生態系への影響が懸念される。生物学的な処理法以外には、物理・化学的な処理法として

AOPs (Advanced Oxidation Processes) が注目されている。AOPs は主に何らかの方法でラジカル種を発生させ、ラジカルにより対象物質を酸化、分解、除去するといったものが主でありオゾン酸化¹⁾、過酸化水素^{2,4)}、過酸化水素-紫外線照射^{5,6)}、またはこれらの組み合わせ^{7,9)}などの方法が検討されている。また、AOPs の新たな方法として高電圧パルス放電処理がある。これは、様々な酸化力の高い物質を放電チャンネルから直接的に水中に生成することができる点から、対象となる処理液体を選ばないと考えられている。

放電プラズマを利用した AOPs としてはフェノール^{10,11)}、トリニトロトルエン、3,4-ジクロロアニリン¹²⁾など多くの有機物質の分解が報告されている。放電プラズマは従来の活性汚泥法では難分解性の物質を分解できるため、これらの組み合わせによる高度排水処理が有望視されている^{13,14)}。特に活性汚泥法で生じる余剰汚泥の処理に放電プラズマを応用する場合、微生物群破壊能力とともにタンパク質の分解に関する知見が必要であるが、現在までのところ、放電プラズマによるタンパク質の分解に関する報告はない。

そこで本研究では、水中プラズマ技術を利用し、可溶性タンパク質がどの程度分解されるのかを確認することを目的とする。モデルタンパク質として、牛血清アルブミン、牛乳由来タンパク質を用いて実験を行った。

キーワード : high voltage pulse, albumin, milk, microbubble, decomposition

* 群馬大学大学院工学研究科 (376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Department of Chemical and Environmental Engineering, Gunma University, 1-5-1, tenjin-cho, Kiryu 376-8515, Japan

¹ toshima@cee.gunma-u.ac.jp

2. 実験方法・手順

2.1 高電圧パルス発生装置

高電圧パルス発生装置の回路図を図1に示す¹⁵⁾。交流電源 (AC 100 V) より供給された電気エネルギーはスライドトランスフォーマー (ST), 高電圧変圧器 (HT), 高電圧抵抗 (R) を通してコンデンサー (C) に充電され, ロータリースパークギャップ (RSG) が処理槽側の回路に短絡したとき, 瞬時にコンデンサーより放電され高電圧パルスを形成して処理槽 (TC) に印加される。高電圧抵抗 (R) の抵抗値は 47 kΩ, コンデンサー容量 (C) は 8 nF, 周波数は 50 Hz であり, 印加電圧はそれぞれの実験で変化させた。

2.2 同心円筒型二重らせん型プラズマリアクターおよび実験システム

本実験で使用した, 二重らせん型プラズマリアクターおよび実験システムを図2に示す。リアクターの内外径は 11 mm, 外内径は 24 mm, 長さ 100 mm, 容量 12 mL となっており, 内側に高電圧電極と外側にアース電極が巻かれている。電極はステンレススチール製 (高電圧側の直径: 0.5 mm, アース側の直径 1.2 mm), 電極間距離は 5 mm である。これら二種類のワイヤー電極はそれぞれ 20 巻きされており, そのうち 15 巻き程度が対向した構造になっている。試料はリアクター下部に設けられた流入口より入り, 内外形と外内径の間を通過して, リアクター上部より流出させた。流量は 200, または 900 mL/min で循環させた。放電プラズマを発生させやすくするための SPG 膜式マイクロバブル発生装置はリアクターの直前に設置した。循環ポンプにより試料は SPG モジュールにセットされた SPG 膜管 (平均細孔径 10 μmφ) に流入する。そこでエアープンプにより加圧された空気がレギュレーターを通して SPG 膜管の外側から内側を流れる試料へ流入させ, マイクロバブルとした。空気圧はマイクロバブル水の状態を確認しながら調整し, 十分に白濁した状態 (ミルクィウォーター) とした。処理量は全体で 250 mL で, 図2のビーカーとリアクターを循環させた。

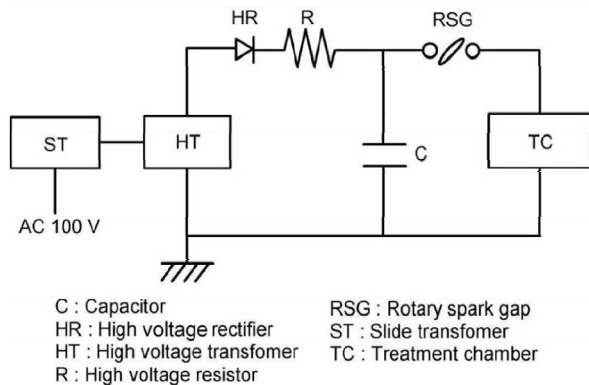


図1 パルス電圧発生回路

Fig. 1 Circuit diagram of pulse generator.

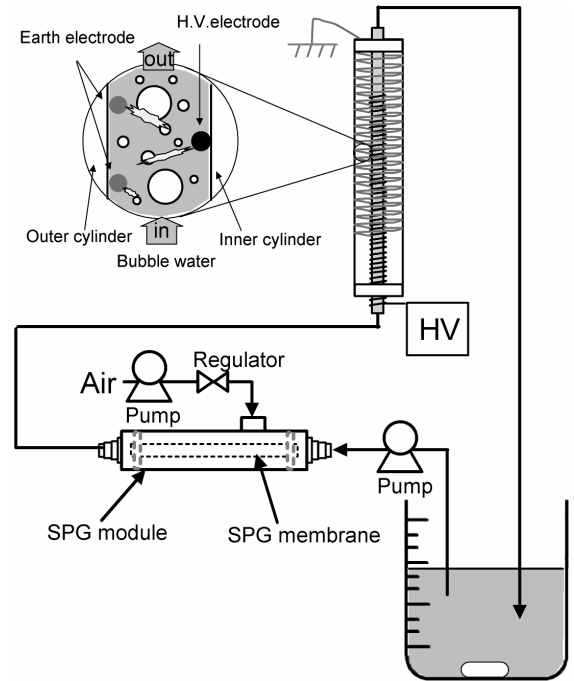


図2 プラズマリアクターおよび実験システム

Fig. 2 Schematic of plasma reactor and experimental system.

また図3に放電時の典型的な電圧および電流波形を示す。波形は常に一定ではないが, パルス状電圧印加直後にスパーク様放電が発生する場合 (図3(A)) と数マイクロ秒後にスパーク様放電が発生する場合 (図3(B)) が混在していた。

2.3 実験試料と評価方法

モデルタンパク質として, 牛血清アルブミン (和光純薬), および市販の無調整牛乳を使用した。アルブミンは 0.1 mg/mL となるように蒸留水に溶解し, 使用した。また牛乳はそのまま使用するか, 蒸留水で希釈してサンプルとした。牛乳の希釈率は 5 倍, 125 倍, および 250 倍で行った。

プラズマ処理後のサンプルは図2のビーカー部より 10 分毎にサンプリングし, 分析した。分析は最低 3 回行い, 測定値は平均値とした。分析方法は SDS-PAGE (SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動) とブラッドフォード法を用いた。SDS-PAGE はミニスラブゲル電気泳動装置 (ATTO Co.) を使用し, 手順やサンプル調整は市販の実験書¹⁶⁾に従った。初期サンプル量は 1 レーンあたり 20 μL (タンパク質量はおおよそ 20 μg) で調整した。またブラッドフォード法は Bradford Reagent (SIGMA-ALDRICH Co.) を使用し, サンプル 0.5 mL に Bradford Reagent 2 mL を混合させ, 10 分後に 595 nm の吸光度を測定し, 検量線からタンパク質濃度を決定した。検量線は 0.1 mg/mL までの濃度の牛血清アルブミンを用いて作成し, これ以上の濃度のサンプルの測定の場合には, サンプルを事前に希釈して測定可能範囲にした後にブラッドフォード法を行った。分光光度計は UV-1240 (島津製作所) を使用した。

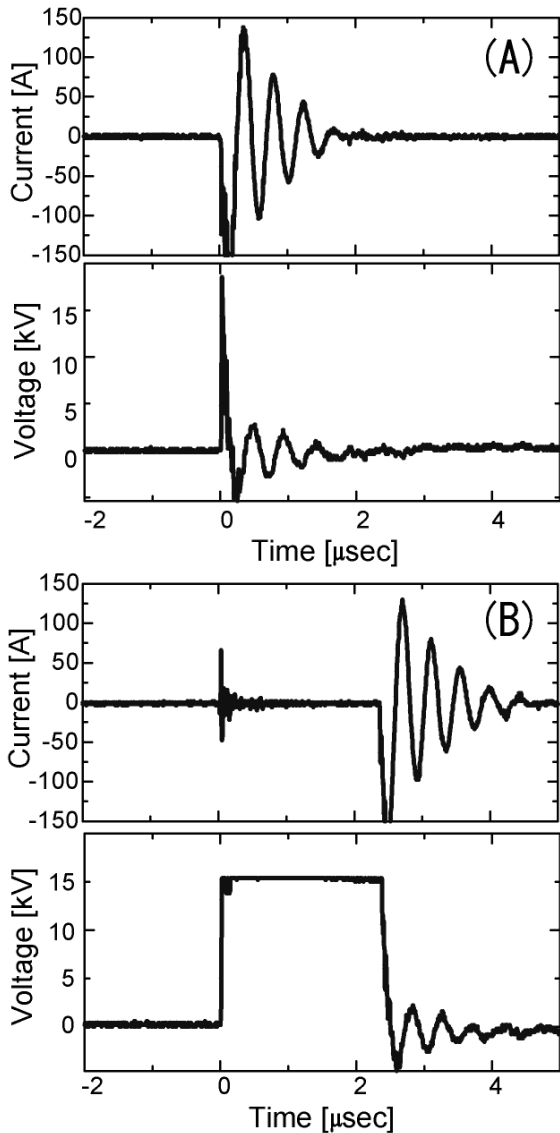


図3 典型的な電圧電流波形. 遅れがない場合 (A) とある場合 (B)

Fig. 3 Typical voltage and current wave forms with delay (B) and without delay (A).

3. 実験結果および考察

3.1 アルブミンの分解

まず, 反応器に空気 (マイクロバブル) を加えない条件で実験を行った. 循環液流量は 200 mL/min, 印加電圧は 11 kV で行った. この実験の SDS-PAGE 結果を図 4 (A) に示す. 処理時間 0 min (無処理) では 66 kDa 程度のアルブミンと思われるメジャーバンドが確認できるが, 処理時間に伴うバンドの変化は確認できなかった. この実験条件では放電はほとんど発生せず, パルス電界効果が期待できる条件である. 水中にパルス電圧を印加し, 電界効果を利用してバクテリアを殺菌する方法 (パルス殺菌) は様々な研究者により研究されている^{17,18}. このパルス殺菌の原理は細胞膜の圧縮と続いて起こる電気穿孔であると言われている¹⁹. 実際, 我々もこの実験条件で大腸菌の殺菌を試み, 60 分の処理で 3 桁以上の

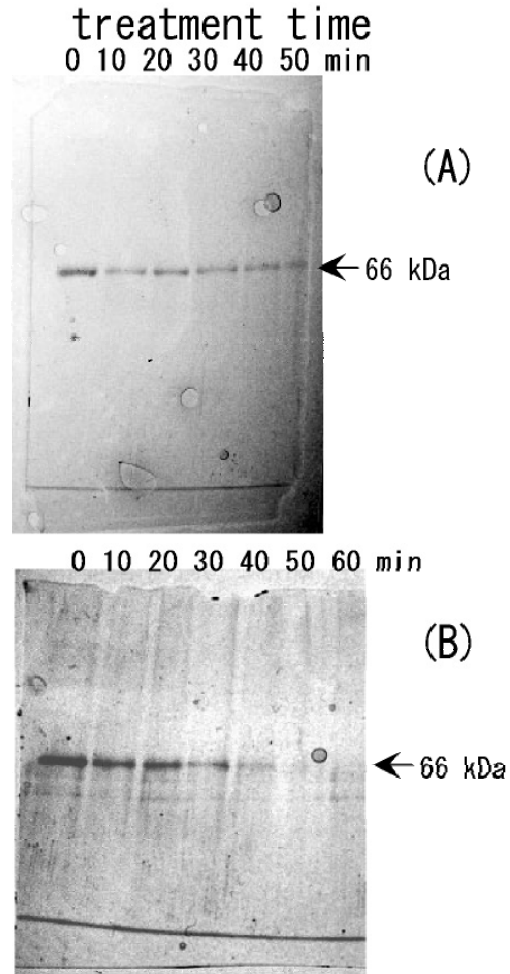


図4 アルブミンの SDS-PAGE (A)マイクロバブルなし, (B)マイクロバブルあり

Fig. 4 SDS-PAGE of albumin without microbubbles (A), and with microbubbles (B).

殺菌効果を確認している (Data not shown). しかしこのようなパルス電界はタンパク質のペプチド結合を切断するような効果はないと考えられる. 筆者らの前報でもパルス電界がタンパク質に与える影響について報告しているが, タンパク質の切断は認められなかったとしている¹⁵. 今回の結果からもこのことが確認された.

一方, 図 4 (B) はマイクロバブルを入れて放電プラズマを断続的に発生させたときのアルブミンの SDS-PAGE 結果を示している. Locke らによる水中放電に関する総説²⁰ で, 水中における放電プラズマの発生は気泡が関与していることを強く示唆している. 本実験においては放電プラズマの発生を誘導するためにマイクロバブルを導入した. これにより放電プラズマの発生を容易かつ連続的にすることが可能となった. したがって本研究で提案した, 二重らせん型リアクターとマイクロバブルの組み合わせは水を処理するための放電プラズマリアクターとして有望であると考えられる. 循環液流量は 200 mL/min, 印加電圧は 14 kV で行ったが, 処理時間とともにアルブミンのバンドが薄くなっているのが確認

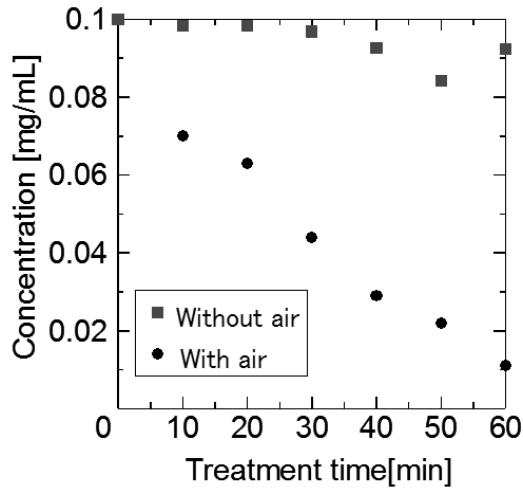


図5 マイクロバブルを導入した場合としない場合のアルブミン濃度の経時変化

Fig. 5 Time courses of albumin concentrations with and without microbubbles.

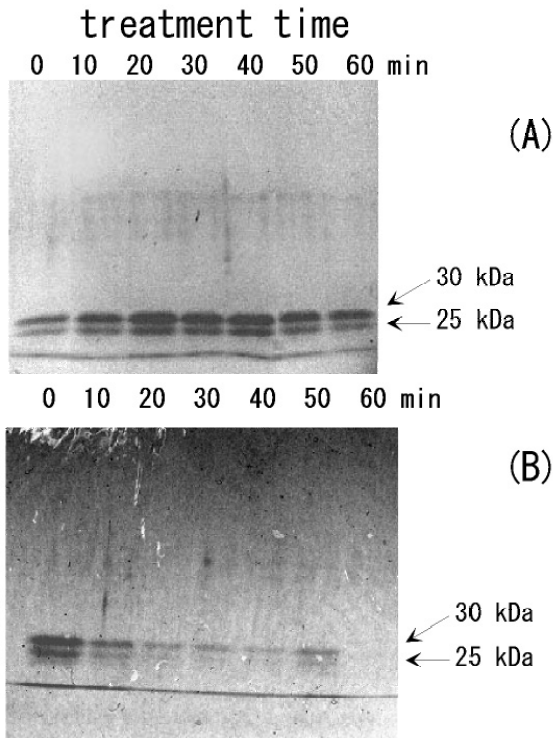


図6 牛乳を5倍希釈(A)および250倍希釈(B)した場合のSDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE of milk proteins with 5 times (A) and 250 times dilution (B).

できる。また図5には図4(A)(B)で行った実験のブラッドフォード法によるタンパク質濃度変化を示している。SDS-PAGEの結果と同様に、パルス電界によるアルブミンの分解は確認できないが、マイクロバブルを導入して放電プラズマを発生させることにより処理時間とともにアルブミンが分解され、溶存タンパク質が減少していることが確認でき

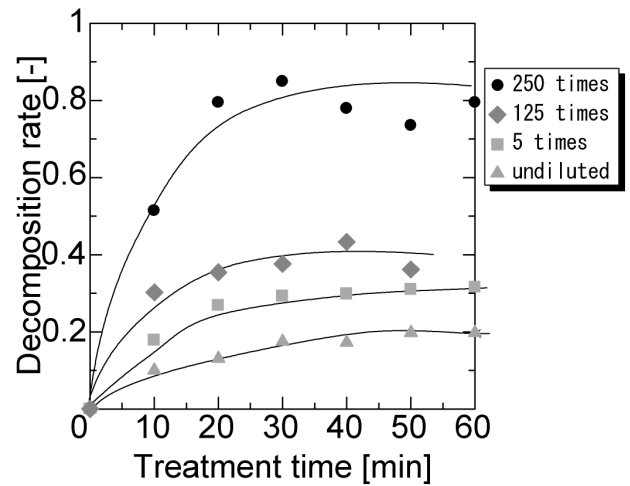


図7 牛乳希釈サンプルの分解率の経時変化

Fig. 7 Effect of the milk dilution times on the decomposition rate.

た。またマイクロバブル単独ではタンパク質の分解は本研究の実験時間では確認できなかったことから、水中のタンパク質を分解するためには放電プラズマを発生させることが必要であると考えられる。また本法によるタンパク質の分解はランダムに起こり、様々な長さのペプチドが中間生成物として発生していると考えられるが、本研究ではSDS-PAGE上でマイナーな低分子シグナルの検出などによる確証を得るまでには至っていない。分解メカニズムについては今後詳細に検討していく予定である。

3.2 牛乳由来タンパク質の分解

アルブミンの放電プラズマ分解が確認されたため、次に牛乳由来のタンパク質の分解を試みた。実験は牛乳をそのまま原液で使用した場合、蒸留水で5、125、250倍と希釈した場合をサンプルとし、それぞれSDS-PAGEとブラッドフォード法で分析した。サンプルの循環液流量は932 mL/min、印加電圧は14 kVで行い、断続的な放電プラズマの発生が目視できたが、発生頻度は希釈により変化していなかった。また電圧電流波形に違いも観察されなかった。図6は5倍希釈、250倍希釈のサンプルのSDS-PAGEを示している。牛乳の主要なタンパク質はカゼインであるが、SDS-PAGE上では約30 kDaと25 kDaの二本のメジャーバンドが観察できた。5倍希釈の場合(図6(A))、SDS-PAGE上では明確なバンドの変化を観察することができなかった。しかし250倍希釈の場合(図6(B))には処理時間とともに二本のバンドが薄くなっていくのが観察されたため、牛乳由来タンパク質も放電プラズマにより分解できることが確認された。図7は四種類のサンプルのブラッドフォード法によるタンパク質濃度変化を分解率として水準化したグラフである。SDS-PAGE上では確認することができなかったが、原液の場合にも60分の処理で20%

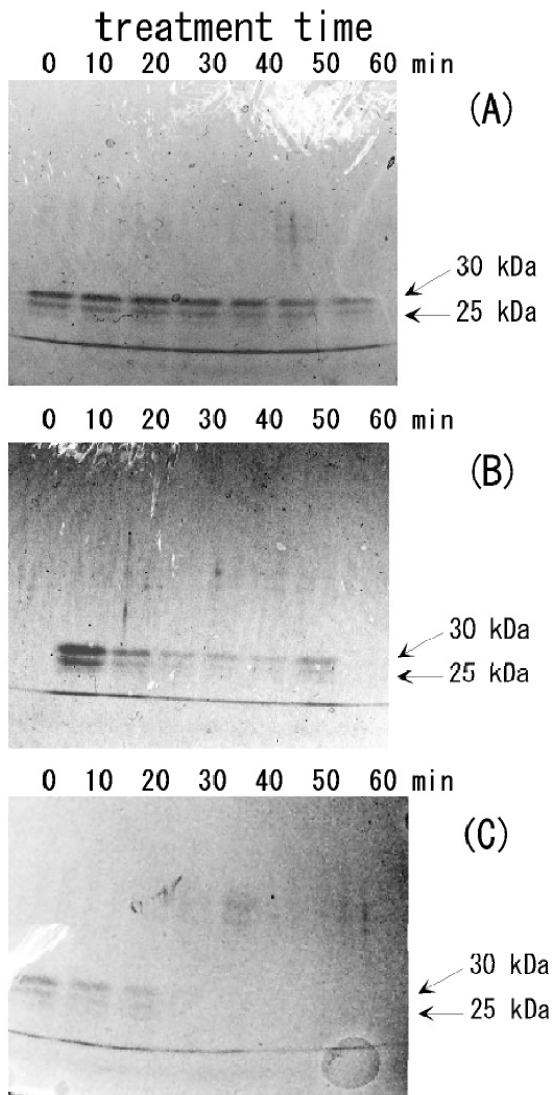


図8 7.5 kV (A), 14 kV (B), および20 kV(C)印加した場合の250倍希釈牛乳由来タンパク質のSDS-PAGE
Fig. 8 SDS-PAGE of milk proteins (250 times dilution) with 7.5 kV (A), 14 kV (B), and 20 kV (C) of applied voltage.

弱分解できていることがわかる。また希釈率とともに分解率も上昇しており、250倍に希釈した牛乳由来タンパク質はおよそ30分で80%程度の分解率を達成している。

また250倍希釈の牛乳サンプルで印加電圧の影響を調べた。図8は印加電圧を7.5 kV, 14 kV, および20 kVで処理したときのSDS-PAGE結果を示している。また図9にはこの実験のブラッドフォード法による分析結果を示している。観察した結果では印加電圧が高くなるにしたがい、放電の頻度、強度が高まることが視覚的に確認された。印加電圧が7.5 kVの時、わずかであるが、バンドが少しずつ薄くなっていることが確認できる(図8(A))。またブラッドフォード法による測定からも7.5 kVの場合には60分で20%程度の分解ができるこ

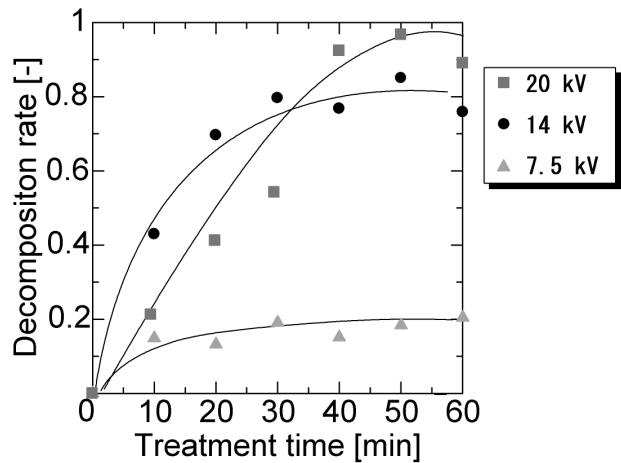


図9 牛乳由来タンパク質の分解率における印加電圧の影響

Fig. 9 Effect of applied voltage on the decomposition rate of milk proteins.

とがわかった(図9)。14 kV, 20 kVと印加電圧を高くするにしたがい、分解はSDS-PAGE上で顕著になっており、14 kVの時には60分後、20 kVの時には40分後にはほとんどバンドがなくなっていた(図8(B), (C))。またブラッドフォードの結果はデータのバラつきがあり、処理時間が30分未満の時には分解率が逆転しているものの、最終的には20 kVの場合のほうが分解率が高くなっており、50分後には95%程度分解できていた。したがって印加電圧は高いほうが本システムにおいては放電頻度、強度が増大し、結果として高い分解率を得ることができると考えられる。

本研究ではマイクロバブルを併用した水処理のための放電プラズマリアクターを提案し、溶存タンパク質の分解を実証した。しかし分解のメカニズムについては明らかではない。ペプチドの低分子化が確認されなかったことから、放電プラズマに接したタンパク質は急激な分解が起こっているものと推定される。したがっていかに効率よくかつ広範囲に放電プラズマを発生させ、水中のタンパク質と接触させるかが放電リアクターの設計上必要である。本研究で提案した同心円筒型二重らせん型プラズマリアクターとマイクロバブルの組み合わせの有効性は実証されたが、さらに改良が必要であると思われる。また消費エネルギーに関しては本研究では検討してこなかったが、投入電力を少なくする方策も必要である。しかし放電プラズマを利用した排水処理技術は、本研究で実証したタンパク質の分解も含め、非常に複合的な分解処理を同時に行うことが可能と考えられるため、既存の活性汚泥法などの生物学的排水処理技術と併用することにより、高度の排水処理が可能になるものと期待される。

4. 結言

排水処理用の放電プラズマリアクターを提案するとともに、溶存タンパク質の分解について実験的検証を行った。得られた結果を以下にまとめる。

(1)同心円筒型二重らせん型プラズマリアクターとマイクロバブルを組み合わせることで、パルス高電圧を印加することで比較的安定した水中放電プラズマを発生させることが可能であることを明らかにした。

(2)アルブミンをモデルタンパク質として使用した実験では、マイクロバブルを導入しない場合にはほとんど放電プラズマは発生せず、アルブミンの分解も起こらないことを確認した。またマイクロバブルを導入した場合には放電プラズマが断続的に発生し、これに伴いアルブミンの分解が起こることを SDS-PAGE およびブラッドフォード法により確認した。

(3)牛乳および牛乳を希釈したものをサンプルとした場合、アルブミンの場合と同様にタンパク質の分解が確認された。特に250倍希釈牛乳を用いた場合には SDS-PAGE 上で顕著な分解が確認され、20 kV を印加した場合、50 分で95%程度分解できることを証明した。

参考文献

- 1) B. Langlais, D.A. Reckhow and D.R. Brink: *Ozone in Water Treatment, Application and Engineering*, Lewis Publishers, Chelsea, U.K. (1991)
- 2) A. Safarzadeh-Amiri, J.R. Bolton and S.R. Cater: *J. Adv. Oxid. Technol.*, **1** (1996) 18
- 3) C. Walling and T. Weil: *Int. J. Chem. Kinet.*, **8** (1974) 507
- 4) R.G. Zepp, B.C. Faust and J. Hoigne: *Environ. Sci. Technol.*, **26** (1992) 313
- 5) G. Ruppert, R. Bauer and G. Heisler: *Chemosphere*, **28** (1994) 1447
- 6) G. Ruppert, R. Bauer and G. Heisler: *J. Photochem. Photobiol.*, **73** (1993) 75
- 7) W.H. Glaze and J.W. Kang: *Ind. Eng. Chem. Res.*, **28** (1989) 1573
- 8) W.H. Glaze and J.W. Kang: *Ind. Eng. Chem. Res.*, **28** (1989) 1580
- 9) G.R. Peyton and W.H. Glaze: *Environ. Sci. Technol.*, **22** (1988) 761
- 10) B. Sun, M. Sato and J.S. Clements: *Environ. Sci. Technol.*, **34** (2000) 509
- 11) P. Lukes, M. Clupek, P. Sunka, F. Peterka, T. Sano, N. Negishi, S. Matsuzawa and K. Takeuchi: *Res. Chem. Intermed.*, **38** (2005) 285
- 12) D.M. Willberg, P.S. Lang, R.H. Hochemer, A. Kratel and M.R. Hoffmann: *Environ. Sci. Technol.*, **30** (1996) 2526
- 13) D.C. Yee, S. Chauhan, E. Yankelevich, V. Bystritski and T.K. Wood: *Biotechnol. Bioeng.*, **59** (1998) 438
- 14) J.P. Scott and D.F. Ollis: *J. Environ. Eng.*, **122** (1996) 1110.
- 15) T. Ohshima, T. Tamura and M. Sato: *J. Electrostat.*, **65** (2007) 156
- 16) 日本生物工学会編:「*生物工学実験書*」, 培風館 (1992)
- 17) N. Kitajima, K. Ueda, T. Ohshima, M. Sato: *Tex. Res. J.*, **77** (2007) 528
- 18) B.L. Qin, F.J. Chang, G.V. Barbosa-Cánovas and B.G. Swanson: *Lebensm. Wiss. Technol.*, **28** (1995) 564
- 19) U. Zimmermann: *Biochim. Biophys. Acta*, **694** (1982) 227
- 20) B. R. Locke, M. Sato, P. Sunka, M. R. Hoffmann and J.-S. Chang: *Ind. Eng. Chem. Res.*, **45** (2006) 882