

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580160

研究課題名(和文)連続加熱条件下における食品タンパク質付着凝集挙動の速度論的解明

研究課題名(英文) Analysis of adhesion and aggregation behaviors of food proteins during continuous heat processing

研究代表者

崎山 高明 (SAKIYAMA, Takaharu)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：70170628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ホエイと卵白の連続加熱工程における機器表面へのタンパク質の付着挙動解明を目的として、構成タンパク質の凝集とステンレス鋼表面への付着との関係を中心として、速度論的な観点も含めた解析を行った。ホエイを対象とした研究では、液中での加熱凝集体形成と競合して付着が進行することを明らかにした。卵白タンパク質を対象とした研究では、共存する小さな多価イオンがステンレス表面に吸着してタンパク質の付着に大きな影響を与えることを明らかにした。以上、付着機構解明と速度論的解析をさらに進め、付着抑制策を確立するための有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Adhesion of proteins to stainless steel heat exchange surfaces during continuous heat processing of whey and egg white was studied, especially focusing on the relationship between the extent of thermal aggregation and the adhesion ability of the aggregates. The results obtained for whey proteins indicated that the adhesion to stainless steel surface proceeded competitively with the thermal aggregation in liquid medium. The results obtained for egg white indicated that small multivalent anions adsorbed onto the stainless steel surface affected the adhesion of egg white proteins. These results will be useful for further analysis of both mechanism and kinetics of protein adhesion as well as for effective prevention of protein adhesion.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品タンパク質 熱凝集 付着 連続加熱装置 ホエイ ラクトグロブリン 卵白 オボアルブミン

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質を多量に含む液状食品を連続加熱殺菌すると、タンパク質が熱凝集により熱交換器内壁に付着して次第に流路が狭窄し、送液圧力が増大する。このため、製造現場では作業をある一定の時間で停止しては熱交換器を洗浄する必要に迫られており、生産効率向上に対する大きな障害となっている。速度論的な観点も含めて熱交換器表面における付着物の形成過程を把握することが基礎として必要とされている。

(2) 牛乳を連続加熱処理した場合の熱交換器表面での付着物形成に関する研究はこれまでに少なくない。一般に連続加熱殺菌装置の低温部ではタンパク質主体の付着物が生じ、その付着の過程にはタンパク質（特にホエイタンパク質）の熱変性と SH/SS 交換反応に基づく分子間架橋の形成が寄与することが既に知られている。ただし、表面に付着するのが液中で凝集したタンパク質の分子塊なのか、変性はしているが未凝集の単一分子なのかという点や、変性 - 凝集 - 物質移動 - 付着のいずれの段階が律速因子となるのかという点など、未解明の点も少なくない。また、牛乳とホエイタンパク質濃縮物（WPC）とでは、連続加熱殺菌時の熱交換器内での付着物形成挙動に差異のあることが知られており、組成の差異および成分タンパク質間の相互作用の影響が示唆されている。

(3) 卵白や液卵を連続加熱する際の付着物形成に関する研究例は極めて少ない。

2. 研究の目的

(1) ホエイおよびホエイタンパク質について、熱凝集の進行がステンレス鋼表面への付着に及ぼす影響を明らかにするとともに、試作した小型連続加熱実験装置を用いた連続加熱実験を行い、特に速度論的観点から付着現象の解析を行う。

(2) 卵白タンパク質についても、各種条件下でステンレス鋼表面への付着挙動の解析を行い、これらを総合して付着機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) ホエイタンパク質溶液

ホエイ粉末を水に溶解してホエイ溶液とした。ホエイ構成タンパク質成分は市販試薬を用い、25 mM bis-tris 緩衝液 (pH 6.85) に溶解した。これらの試料溶液を指定の温度にて適当な時間（通常は 120 分）予備加熱した。非還元状態で SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、予備加熱によって生成したタンパク質凝集体の凝集度合いを調べた。また、変性剤存在下でエルマン試薬と反応させる方法により凝集体に存在する SH 基を定量した。

(2) 卵白タンパク質溶液

卵白タンパク質の主要成分である卵白アルブミンとリゾチームについては市販試薬を用いた。オボムコイドについては、卵白から精製した標品を用いた。各々を 50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) に溶解して実験に供した。

(3) ステンレス鋼表面に対する付着

ステンレス鋼微粉末とタンパク質溶液を共存させ、指定の温度にて 60 分間振盪した。振盪前後の溶液中のタンパク質濃度を BCA 法により測定し、その減少からステンレス鋼表面に対する付着量を算出した。

(4) 連続加熱実験

HPLC ポンプと HPLC 用ステンレス管を用いて図 1 に示す装置を試作した。試料液は常に一定流速で送液され、加熱槽で加熱される。加熱管壁面に試料成分が付着すると、加熱部前後の圧力損失が増加する。そこで、加熱部前後の圧力を経時的に測定し、圧力損失の変動を調べた。なお確認のため、実験終了後に加熱管を切断し、内部付着物の量や様子を目視で観察した。

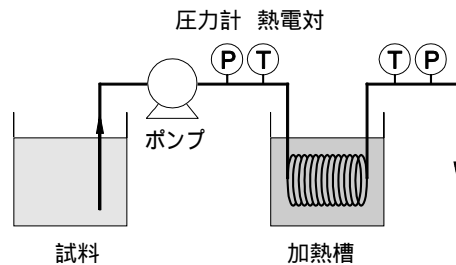


図 1 小型連続加熱装置

4. 研究成果

(1) β -ラクトグロブリンの熱凝集と付着
ホエイの主要タンパク質である β -ラクトグロブリンをモデルとして、加熱凝集状態と付着性との関係を調べた。加熱温度を変化させた β -ラクトグロブリン試料を調製し、75 でステンレス鋼表面に対する付着実験を行った結果、図 2 に示すように、加熱温度が 70 を越えると β -ラクトグロブリンが有意に付着し難くなること明らかになった。

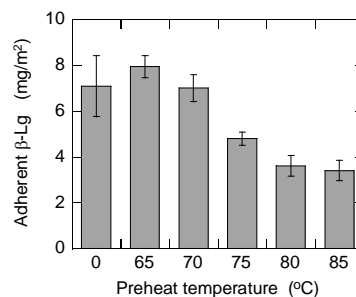


図 2 予備加熱した β -ラクトグロブリンの 75 での付着量の比較

また、 γ -ラクトグロブリンの総SH基量には加熱後も大きな変化が見られなかったことから、凝集に起因する立体障害が付着量の減少をもたらす可能性が示された。

(2) ホエイタンパク質複合系の付着
共存タンパク質の影響を調べるため、第二成分である β -ラクトアルブミン (β -La) に着目し、 γ -ラクトグロブリン (γ -Lg) との混合系について、予備加熱した試料の凝集体生成状況を調べるとともに、ステンレス鋼表面に対する付着特性の解析を行なった。 β -La / γ -Lg 混合試料を 75 以上で予備加熱すると、遊離SH基を持たない β -La の凝集体形成に対する寄与率が大きくなること、75 におけるタンパク質付着量が減少することが示された。さらに、凝集体が未形成の試料から付着する成分はほとんどが γ -Lg であるのに対し、予め凝集体が形成された試料では β -La の付着に寄与する割合が高くなることが示された。以上の結果は、高温においては液中で形成された凝集体がステンレス鋼表面への付着に寄与することを示唆するものと考えられるが、詳細についてはさらに検討が必要である。

(3) ホエイの熱凝集特性と連続加熱実験
ホエイ溶液とホエイタンパク質濃縮物 (WPC) 溶液についても上記と同様に熱凝集性の検討を行った。同じ固形分濃度で比較すると、タンパク質含量の多いWPC溶液の方が凝集体形成は速いことが示された。また、各々の試料を小型連続加熱実験装置によって一定流速条件下で連続加熱処理を行い、加熱管内付着量の増加過程を評価した。その結果、WPCを試料とした場合の方が明らかに付着速度は低かった。以上の結果を併せて考察すると、付着と液中の凝集体形成とは競合しており、液中の凝集体形成が起こりやすい条件では付着量が少なくなると考えられる。以上の知見を基に、小型連続加熱装置による連続加熱実験における加熱管内壁への付着経過を記述可能な速度論モデルの構築を行った。試料中のタンパク質のうち加熱時にステンレス鋼表面に付着可能な画分の濃度 C は、試料の熱凝集が進むと低下する。よって、連続加熱管内流れ方向の定常温度分布のみを考慮すると、濃度 C は加熱管内の位置の関数と考えられる。そこで、付着速度が濃度 C の一次反応で記述でき、アレニウス型の温度依存性をもつと仮定して、ホエイを試料とした連続加熱実験のモデル計算を行った結果、加熱管内圧力損失ならびに付着量を推算できる可能性が示された。

(4) 卵白タンパク質の付着機構
卵白タンパク質については、その主要成分である卵白アルブミン (OVA)、オボムコイド (OVM)、リゾチーム (LYZ) のステンレス鋼表面に対する付着量を各種条件下で比較検

討した。その結果、クエン酸等の多価陰イオンの共存下で酸性タンパク質である OVA と OVM の付着量が低減、塩基性タンパク質である LYZ の付着量が増加することが示された。これらの結果は、多価陰イオンがタンパク質に先んじてステンレス鋼表面に吸着し、静電的相互作用によってタンパク質の付着に影響を及ぼすという仮説によって説明できる。そこで、多価陰イオンを含む水溶液でステンレス鋼表面を予め洗浄した後に 30~80 の温度条件下で付着実験を行ったところ、付着温度によって程度に差はあるものの、OVA と OVM の付着が抑制された。図3にクエン酸で予備洗浄した場合のOVA付着量の付着温度依存性を例として示す。この結果は上述の仮説の妥当性を支持するとともに、多価陰イオンによる予備洗浄が加熱条件下も含めたタンパク質付着抑制法として有望であることを示すものである。

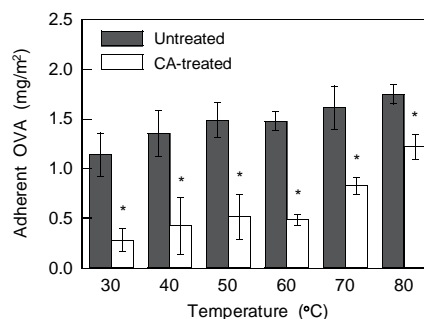


図3 クエン酸(CA)処理による卵白アルブミン(OVA)付着抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- Takaharu SAKIYAMA, Kentaro SATO, Sanae TSUDA, Hiroki SUGIYAMA, Tomoaki HAGIWARA, Citric acid pretreatment for suppressing adhesion of major egg allergens to a stainless steel surface, Food Control, 査読有, 32, 2013, 702-706. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.02.002
 崎山高明, 卵白タンパク質のステンレス鋼表面に対する付着挙動, 日本食品科学工学会誌, 査読無, 59巻, 2012, 227-230 DOI: 10.3136/nskkk.59.227

〔学会発表〕(計4件)

- 崎山高明, 佐藤謙太郎, 津田早苗, 杉山広樹, 萩原知明, ステンレス鋼に対するタンパク質付着抑制法としてのクエン酸洗浄, 第14回日本食品工学会年次大会, 2013年8月9日, 京都テルサ(京都市).
 金子英基, 萩原知明, 崎山高明, ホエイタンパク質モデル共存系における熱凝集とステンレス鋼表面に対する付着挙動, 日本農芸化学会2013年度大会, 2013年3月26日, 東北大学(仙台市).
 金子英基, 萩原知明, 崎山高明, ホエイ

構成タンパク質の加熱に伴う汚れ付着挙動の解析，第 13 回日本食品工学会年次大会，2012 年 8 月 10 日，北海道大学（札幌市）。

金子英基，萩原知明，崎山高明，ラクトグロブリンの熱凝集体形成がステンレス鋼表面への付着挙動に及ぼす影響，日本農芸化学会 2012 年度大会，2012 年 3 月 24 日，京都女子大学（京都市）。

6．研究組織

(1)研究代表者

崎山 高明（SAKIYAMA, Takaharu）

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：70170628