

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06539

研究課題名(和文) ナノセンシング技術による汚れの付着脱離過程の定量モデル化予測と付着抑制技術開発

研究課題名(英文) Prediction of soil adsorption and desorption process by nano-sensing method and application for soil deposition suppression

研究代表者

萩原 知明 (Hagwiara, Tomoaki)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：20293095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アドミッタンス解析に基づく水晶振動子マイクロバランス法によりタンパク質、微生物、実際の食品由来汚れの付着挙動および脱離挙動を定量的に記述することに成功した。油性汚れの脱離過程についても残存汚れ量の時間変化を定量的に記述することに成功したD-factorを用いて、付着汚れ層の動的質的变化に関する情報も得られた。タンパク質のステンレス鋼への付着量を減少させるクエン酸処理は付着量減少のみならず付着速度も小さくする効果があることが分かった。また、タンパク質性汚れの付着に關与するタンパク質の加熱凝集過程を示唆走査蛍光強度測定で解析可能であるかについての可能性についても一部明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The adhesion and desorption process of protein, microorganism, food soils were successfully described quantitatively by the aid of the quartz crystal microbalance based on admittance analysis. The desorption process of fat soils was also successfully described quantitatively. By using the D-factor, dynamic properties of soil layer on the surface was obtained. It was shown that the citrate treatment on stainless steel surface, which was one method to suppress protein adhesion, reduced not only adhesion amount but also adhesion rate. In addition, the possibility of differential scanning fluorimetry for investigating heat-induced protein aggregation, which affects protein adhesion process at higher temperature was also shown.

研究分野：食品工学

キーワード：水晶振動子マイクロバランス法 QCM-A タンパク質 洗浄 付着 脱離

1. 研究開始当初の背景

食品から半導体に至るまであらゆる工業製品の製造プロセスにおいて、製品への異物混入を防止し装置の性能を維持するため、汚れを除去する装置洗浄は不可欠である。食品・医薬品製造においては、装置に付着残存した食品成分や生体由来物質が、微生物の格好の生育の場となり、製品の品質低下および製品を摂取する人の健康被害を引き起こす事故が後を絶たない。このような事故防止の要として、洗浄の役割は極めて大きい。近年の製造規模の拡大、流通の広域化に伴い、洗浄不足による事故は大規模化・広域化する傾向にあり、求められる洗浄レベルは上昇している。一方で、洗浄は、多量の水を必要とする。例えばビール工場では一日当たり換算して、一般世帯 5600 世帯分に相当する約 4700 トンの水の水を使用しており、そのうちの大半が洗浄水である(キリンビール環境白書 2011、東京都水道局平成 21 年度生活用水等実態調査より)。また、4700 トンの水使用の際に、給水ポンプ稼働や排水処理等で消費される電力使用量は、約 500 世帯の電力使用量に相当する(TOTO 株式会社パンフレット「節電から節水」および電気事業連合会 2009 年値より)。世界的な地球環境保全の要求から、洗浄水量の削減は待たなしの状況にあるのは言うまでもない。すなわち、現在、洗浄技術は一層の高度・精密化と効率化の両立を迫られている。こうした状況に的確に対処するためには、洗浄に関わる諸現象を科学的に理解し、合理的な指針に基づき、洗浄操作の効率化や付着制御技術を実現することが不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では種々の汚れの蓄積過程ならびに洗浄時の脱離過程を QCM 法でリアルタイム測定するとともに、そのモデル化を試み、汚れの蓄積過程および脱離過程の定量的な予測を目指した。併せて、モデル化解析によって得られる汚れの蓄積速度や汚れの固体表面に対する結合定数を定量的な指針として用いることで、合理的な付着抑制技術の開発への応用を試みるものとした。

3. 研究の方法

(1) 実験試料

付着させる汚れとして、標準モデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(BSA)やリゾチームの溶液、サケ魚肉の水抽出液、大腸菌、各種飲料(野菜ジュース、ウーロン茶、牛乳)、トリオレイン(油性物質)を用いた。汚れを付着させる固体表面には、食品ならびに医薬品の製造装置の素材として一般的なステンレス鋼を用いた。脱離操作時に加える洗剤としては、市販のタンパク質分解酵素入り洗剤、および大規模な食品製造装置の洗剤として広く一般に用いられている水酸化ナトリウム溶液を用いた。

(2) アドミッタンス解析法に基づく水晶振動子マイクロバランス法による汚れの付着および脱離挙動の解析

実験装置には AFFINIX QN Pro (株アルバック)を用いた。測定セルには水晶振動子表面をステンレス鋼でコーティングした特注品を用いた。トリオレイン以外の汚れについては、はじめに測定セル内に溶媒を加え、そのまま装置が安定するまで約 3 時間待機した。その後、試料溶液(各種試料溶液)をセル内に加え、ステンレス鋼表面への汚れの付着量測定を 1 時間行った。その後、洗剤を加え、ステンレス鋼表面からの汚れの脱離挙動をさらに 1 時間にわたって測定した。トリオレインを汚れとして用いる場合は、トリオレインを溶かしたヘキサンを水晶振動子表面に塗布乾燥して付着させた後、蒸留水をセルに加えて水洗浄を行い、さらに洗剤を加えた洗浄を行った。

測定は主に 25℃で行った。食品の調理工程を想定して一部の試料については 10℃～55℃での測定も行った。

(2) 示差走査蛍光強度測定によるタンパク質の加熱凝集過程の関連の検討

加熱時のタンパク質性汚れの付着に関するタンパク質の加熱凝集過程を示差走査蛍光強度測定(DSF)で解析可能であるかについての可能性についても検討を行った。リゾチーム溶液を実験試料として 30℃～98℃の温度走査範囲にて DSF 測定(Lightcycler II; ロッシュダイアグノステイクス(株))を行った。同様の加熱処理を行ったリゾチーム溶液を SDS-PAGE より加熱凝集挙動を調べ、DSF 測定結果と比較することで、DSF のタンパク質加熱凝集過程の解析可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) タンパク質の付着挙動

QCM-A を用いることで、溶媒の粘度の影響を受けることなく、タンパク質の付着脱離挙動を精密に測定することができた。室温以上の測定は試料の蒸発防止用の治具を作成して使用することで、10℃～55℃の温度域で付着脱離挙動を安定して測定することが可能となった。タンパク質の付着過程は、以下の stretched exponential 型の関数を含む形式の関数で良好に近似でき、付着過程の定量的なモデル化と予測が可能となった。

$$\Delta m = \Delta m_{\infty} \left[1 - \exp\left(- (kt)^{\beta}\right) \right]$$

Δm : 汚れの付着量
 Δm_{∞} : 汚れの飽和付着量
 k : 付着速度定数
 t : 時間
 β : ラングミュア吸着過程からの逸脱の程度を表す

指数

BSA の付着脱離過程に関しては、D-factor の時間変化を測定・解析することで、タンパク質の付着層形成は、付着したタンパク質の再構成による緻密化を伴うこと、理想的な吸着過程であるラングミュア吸着過程とは異なる過程であることを明らかにした。

(2) サケ抽出液由来汚れの付着脱離過程

サケ抽出液由来のタンパク質性汚れの付着層形成において、抽出液の濃度が低いときは、付着汚れ量が時間と共に増加した後、徐々に減少するオーバーシュート現象がみられること、高濃度では時間ともに単調に増加することを見出した。D-factor の時間変化の解析より、低濃度では表面に付着したタンパク質分子が広がることにより不可逆的に付着することで、表面専有面積を増すことによりタンパク質付着量が減少すること、高濃度では、付着したタンパク質分子から成る付着汚れ層の緻密化が起きていることが示唆された。

(3) 大腸菌の付着脱離挙動

大腸菌懸濁液を添加することにより、ステンレス鋼表面の質量は増加し、かつ更に洗剤を加えることにより、質量の減少が見られたことから、QCM-A により大腸菌のステンレス鋼表面への付着および脱離挙動を測定することが可能であることが分かった。

(4) 各種飲料（野菜ジュース、ウーロン茶、牛乳）の付着挙動

野菜ジュース、ウーロン茶、牛乳を添加することで、ステンレス鋼表面の質量は増加したことから、QCM-A によりこれらの飲料由来の汚れのステンレス鋼表面への付着挙動を測定することが可能であった。また、これらの汚れの付着過程もタンパク質と同様に stretched exponential 型の関数を含む形式の関数で良好に近似でき、近似の過程で求められる付着速度定数を用いることで、付着速度を定量的に評価できることが明らかとなった。

(5) トリオレイン（油性汚れ）の洗浄時の脱離挙動

トリオレインを溶かしたヘキサンを水晶振動子表面に塗布乾燥して付着させた後、蒸留水をセルに加えて水洗浄、さらに洗剤を加えた洗浄操作を行なうことで、QCM-A により検出されるステンレス鋼表面の質量は減少した。このことから、QCM-A を用いることでステンレス鋼表面に付着した油汚れの洗浄モニタリングが可能であることが示唆された。トリオレインを付着させたステンレス鋼表面油性汚れ（トリオレイン）が付着したステンレス鋼表面の洗浄過程は、洗浄しやすさの異なる 2 つの汚れの脱離過程として、定量的に解析可能であった。

(6) クエン酸処理がタンパク質の付着挙動におよぼす影響の速度論的解析

クエン酸処理を行うことで、BSA の付着量が減少する傾向が見られた。stretched exponential 型の関数による付着速度解析より、クエン酸処理により BSA は付着量が減少するのみならず付着速度も小さくなることが明らかとなった。以上のことより、QCM-A の測定ならびに付着速度解析より、付着抑制処理効果の定量的な評価が可能となった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tomoaki Hagiwara, Phosri Nattawut, Mario Shibata and Takaharu Sakiyama, Monitoring of adsorption behaviors of bovine serum albumin onto a stainless steel surface by the quartz crystal microbalance based on admittance analysis. 査読有, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, Vol.81 (4), pp.783-789. DOI: 10.1080/09168451.2017.1281724

〔学会発表〕(計 5 件)

岡澤健太, 萩原知明, 柴田真理朗, 示差走査蛍光強度測定によるタンパク質凝集過程の解析. 日本食品工学会第 18 回 (2017 年度) 年次大会, 2017 年 8 月 9 日, 吹田.

萩原 知明, ナッタウッド ポースリー, 柴田 真理朗, 水晶振動子マイクロバランス法によるサケ由来汚れのステンレス鋼に対する付着脱離過程の解析. 日本食品工学会第 18 回 (2017 年度) 年次大会, 2017 年 8 月 9 日, 吹田.

萩原 知明, ナッタウッド ポースリー, 柴田 真理朗, 崎山 高明, アドミッタンス解析に基づく水晶振動子マイクロバランス法によるステンレス鋼表面上のタンパク質付着層形成過程に関する研究. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 19 日, 京都.

萩原知明, アドミッタンス解析に基づく水晶振動子マイクロバランス法(QCM-A)による汚れの蓄積ならびに洗浄プロセスのリアルタイム測定. 2016 国際食品工業展, 2016 年 6 月 7 日, 東京.

Tomoaki Hagiwara, Phosri Nattawut and Takaharu Sakiyama, Monitoring deposit formation on food-contact surface and its detaching process on stainless steel surface by the quartz crystal microbalance based on admittance method (QCM-A). 8th

Joint Symposium on Food Science and
Technology between NUS and TUMSAT,
December 3, 2015, Singapore.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 知明 (HAGIWARA, Tomoaki)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号 : 20293095

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし