

機関番号：12614

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560699

研究課題名 (和文) ナノセンシング技術による食品汚れの固体表面に対する吸脱着過程の解析

研究課題名 (英文) Study on adsorption and desorption process of food soil on solid surface by using nano-sensing technology

研究代表者

萩原 知明 (HAGIWARA TOMOAKI)

東京海洋大学・海洋科学部・准教授

研究者番号：20293095

研究成果の概要 (和文)：

食品製造機器の洗浄技術の省エネルギー・省資源ならびに高度・精密化の促進を図る上で、有用な知見を得ることができた。具体的には、ナノセンシング技術である水晶発振子マイクロバランス法により、固体表面に対する食品汚れの付着ならびに脱離の挙動把握が可能となった。また、仮想的なナノセンシング技術といえる分子動力学法により、食品汚れの付着メカニズムについての原子レベルの知見を得ることができた。

研究成果の概要 (英文)：

By using a technique of quartz crystal microbalance, as a nanosensing method, adsorption and desorption behavior of food deposit on solid surface was detected with accuracy. Furthermore, an atomic scale mechanism of adsorption of food deposit on solid surface was revealed by molecular dynamics simulation, a virtual nanosensing method. These accomplishments will be useful hints for energy and resource saving or more advanced cleaning technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究代表者の専門分野：食品工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：吸着、洗浄、水晶発振子マイクロバランス法、QCM、衛生管理、ステンレス、食品汚れ、分子動力学法

1. 研究開始当初の背景

(1) 食品製造において、製品の安全性確保のためには、製造に用いられる装置の洗浄は必要不可欠な操作である。とりわけ、食の流通の大規模化・広域化に伴い、発生する食中毒も大規模化・広域化しており、食中毒防止の鍵となる装置洗浄の重要性は増している。一方で、洗浄は、多量の水とエネルギーが必

要な工程であるが、地球環境保全の観点から、水とエネルギーの削減が待ったなしの状況にある。すなわち、食品製造の場において、洗浄技術は一層の高度・精密化および効率化を迫られているのが現状である。こうした現状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、適切な洗浄条件を構築する他にない。

とりわけ、固体表面に対する汚れ物質の付着および脱着機構の解明は、科学的な指針に基づいた洗浄プロセスの設計を行う際の基盤的情報の1つである。

(2) 汚れ物質の吸着量測定で一般的に用いられている方法は、depletion 法(枯渇法)および swab 法(拭取り法)である。depletion 法は、汚れ物質を含む溶液を固体表面へ接触させた後、溶液中の汚れ物質濃度の減少度から吸着量を求める方法である。また、swab 法は、固体表面を綿棒で拭取って回収した汚れの定量を行うことで、付着量を求めるものである。

(3) これらの方法は、汚れ物質の付着および脱着機構の詳細な解明という点では、大きな欠点がある。枯渇法は、付着による濃度変化を明確に測定する必要があるため、汚れ物質を付着させる固体の形態は、比表面積の大きい粉体に限られる。粉体で測定された付着挙動が、平板(実際の製造装置の表面に相当)と同様であるかは常に議論となっている。拭き取り法では、拭き取り技術の習熟が必要であり、測定値に個人差によるバラつきが生じやすい。そして、両者の最大の欠点が、原理上、吸脱着量をリアルタイムで測定できないということである。これは、科学的な指針に基づいた洗浄プロセス設計に不可欠な汚れの蓄積過程および脱離過程の速度論的な定量モデル化を行う上で大きな障害となる。以上、今後さらに研究を進展させるためには、可能な限り現実の製造装置環境に近い形態で汚れの吸脱着量をリアルタイムで測定可能な実験手法を導入する必要性あるのは明らかであった。

2. 研究の目的

(1) 前述の問題点に対応するため、汚れの付着量測定の手法として、ナノセンシング技術の一つである水晶発振子マイクロバランス法(以下 QCM 法)を用い、現実の製造装置環境に近い形態、すなわち平板上に対する、水溶液中における代表的な食品汚れ(タンパク質)の吸脱着挙動解析を行った。

(2) 平板上での汚れの付着状態についての原子レベルの情報を得て、汚れの付着機構を解明するために、*In silico* なナノセンシング技術と言える分子動力学法(MD 法)を用いて、食品汚れ(タンパク質)の吸着シミュレーションを行った。

3. 研究の方法

(1) QCM 法による食品汚れ(タンパク質)の吸脱着挙動解析

食品汚れとして、乳製品由来の代表的な汚れ成分である β -ラクトグロブリン(β -LG)を

用いた。QCM 測定装置はセイコーイージーアンドジー社製の QCM934 を用いた。QCM は、水晶に交流電圧をかけると振動するという逆圧電効果を利用した微量天秤の手法である。電圧をかける極板の質量が増加すると共振周波数が低減するという現象を利用して、金属表面等の物質吸着をナノグラムレベルでリアルタイムに観測することができる。水晶発振子にはステンレス鋼 SUS304 を極板とするものを用いた。ステンレス鋼 SUS304 は食品設備、一般化学設備に最も広く使用されているステンレス鋼である。この水晶振動子をウェル型セルに装着し、 β -LG の吸脱着の実験を行った。ウェル型セルの模式図を図 1 に示す。

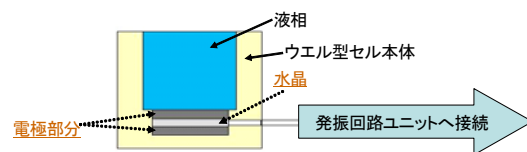


図 1 ウェル型セルの模式図。

水晶発振子は、その表面・裏面双方の電極部分が O-ring で挟み込まれる形態で、セル内部に固定されている。電極の片面はウェル内に注入する液相と接している。液相に接した電極への物質吸着量を測定できる。

以上のセルを用いた QCM 法により滑らかな SUS 平板の表面に対するタンパク質の各種条件下における吸脱着挙動を解析した。

(2) MD 法による食品汚れ(タンパク質)の吸着シミュレーション

QCM 法と同様に、食品汚れ成分として、 β -ラクトグロブリン(β -LG)を選択した。Protein Data Bank の β -LG の結晶構造データより、原子座標データを作成した。固体表面としては、仮想的なステンレス表面として、金の(100)結晶面を用いた。これは、シミュレーションに使用可能なステンレスの構造モデルが現時点では、開発されていないためである。 β -LG 分子および表面の金原子には、それぞれ pH3.0 または、pH7.0 に相当する電荷を設定した。また、中性 pH では β -LG は二量体を形成しているため、pH7.0 に電荷を設定した時には、 β -LG を二量体とした。

はじめに β -LG と金原子のみを配置し、 β -LG 内の原子間距離を固定して、モンテカルロ法により、金原子表面上における β -LG の安定な分子配置を求めた。これを MD 法の β -LG の初期配置とした。次に、水分子(SPC)、 Na^+ 、 Cl^- を配置し、三次元周期境界条件を設定し、粒子数、体積、温度一定(300K)条件下で、1 ステップあたり 2 フェムト(10^{-15})秒、

合計 5~25 ナノ(10^{-9})秒のMDシミュレーションを行い、溶液中における吸着状態の β -LGを再現した。

4. 研究成果

(1) QCM 法による食品汚れ (タンパク質) の球脱着挙動解析

① ステンレス鋼を電極素材として用いた QCM 測定の実験向上の方法確立

既存の QCM 法では、電極の素材として金電極が多く用いられている。そして、金電極上に特定の物質を固定し、その物質と他の物質の相互作用を解析する研究が多い。一方、本研究のように電極素材がステンレス鋼を用い、また電極素材に直接吸着させる状況を測定対象とした研究例は、殆ど存在しない。そのため、使用前の電極の洗浄方法や本測定までの装置安定化手順などが確立されていなかった。

試行錯誤の結果、試行錯誤の結果、電極は 2%NaOH 室温 15 分で洗浄する等などの測定安定性向上の方法を確立できた。

② β -LG のステンレス鋼表面に対する吸着ならびにリンス洗浄時における脱離挙動の解析

①の手順で安定化させた QCM 装置を用いて、各種緩衝液に β -LG を溶解し、ステンレス鋼表面に対する付着挙動を解析した。

β -LG と接すると、即座に水晶発振子の振動数の減少が観測され、 β -LG の吸着を迅速に検知できた (図 2 の β -LG/HEPES)。さらに溶液を除去した後、溶媒の緩衝液で電極表面をリンス洗浄したところ、振動数の上昇がみられた (図 2 の HEPES(2))。これは、リンス洗浄操作により、ステンレス鋼表面に吸着していた β -LG が除去された過程を観察できた可能性がある。また、リンス洗浄後、振動数は、 β -LG の付着操作前の値には戻らなかったことから、ステンレス鋼表面に付着した β -LG には、可逆的および不可逆的に付着している 2 種類のもの存在していることが示唆された。

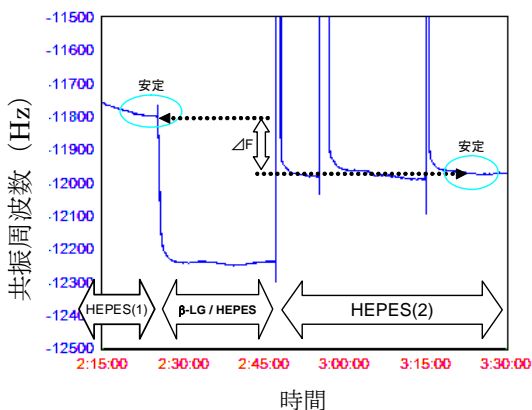


図 2 QCM 測定時の共振周波数の変化。

以上の実験結果については、溶液の粘性の影響も考えられるので、その解釈に当たっては今後慎重に検討する必要がある。

なお、不可逆的に吸着した β -LG の吸着等温線は、ラングミュア式で近似可能であった。(図 3)。さらに、 β -LG 分子の大きさとステンレス鋼の電極表面積の関係から計算される計算上の β -LG 単分子飽和吸着量は、吸着量の実測値から求められる飽和吸着量より多かった。このことから、 β -LG はステンレス表面に対して単分子吸着に近い形態で、吸着していることが示唆された。

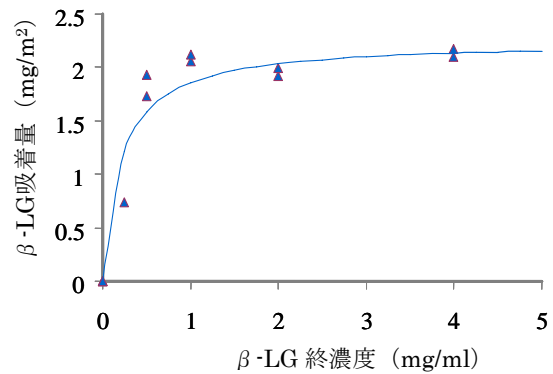


図 3 β -LG のステンレス表面に対する吸着等温線。プロットの実線はラングミュア式によるフィッティングの結果である。

③ 各種共存物質が存在している場合の β -LG の付着挙動の解析、

β -LG を pH7.4 の HEPES またはリン酸緩衝液に溶解し、ステンレス鋼表面に対する β -LG 吸着量を測定した。その結果、リン酸共存時の吸着量は HEPES 共存時と比べて少なくなることが示された (図 4)。

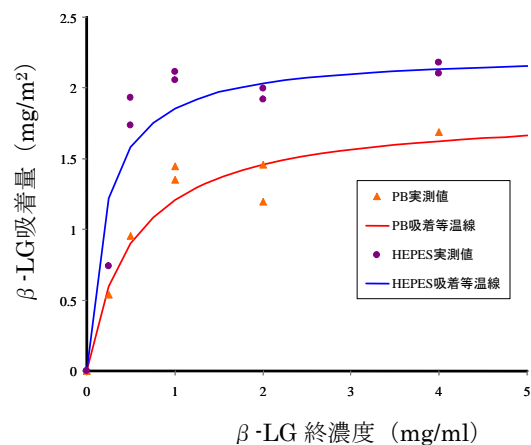


図 4 異なる緩衝液条件での β -LG の吸着等温線。「PB」はリン酸緩衝液を意味する。プロット中の実線は、ラングミュア式によるフィッティングから求めた吸着等温線を示す。

このように同じ pH でも緩衝液の種類によって吸着量が異なることは粉体を用いた実験でも示されており、今回平板でも同様であることが確認できた。また、リン酸共存時には、HEPES 共存時と比較して、リンス洗浄時に β -LG が比較的脱離しやすい傾向が観測できた。

β -LG、リン酸はいずれも pH7.4 において負に帯電していることが知られている。したがって、リン酸共存時における β -LG の吸着量減少ならびに脱離しやすさは、ステンレス鋼表面に先に付着したリン酸分子と β -LG との間に静電的な斥力が働いたことによるものと推察された。

④ステンレス鋼への予備吸着が β -LG の吸着挙動に及ぼす影響の検討

③の結果より、リン酸など負電荷を有する物質を予めステンレス鋼表面に予備吸着させることで、 β -LG の吸着を抑制できることが示唆された。そこで、pH7.4 で負に帯電する溶質として、リン酸、クエン酸(CA)を用い、電極表面にそれらを予備吸着させた場合について、HEPES 緩衝液中での β -LG 吸着量を測定した。

その結果、リン酸およびクエン酸を予備吸着させた場合には、予備吸着させなかった場合に比べて β -LG 吸着量が減少した(図 6)。

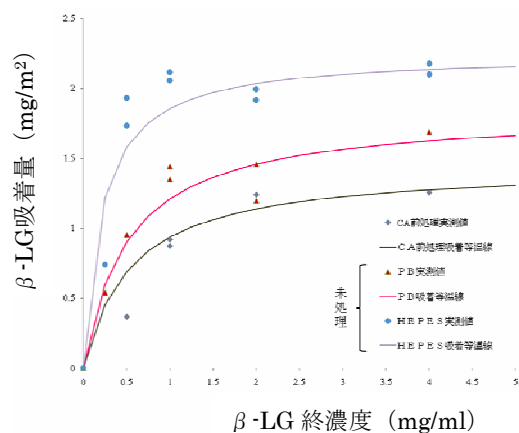


図 6 リン酸およびクエン酸前処理したステンレス鋼表面に対する β -LG の吸着等温線。「PB」はリン酸、「CA」はクエン酸を意味する。

これはステンレス鋼粉体を用いた実験で確認されていたが、ステンレス鋼平板においても同様の挙動が確認されたことを意味する。

さらに、ステンレス鋼表面に対するクエン酸の吸着量を測定し、続けて β -LG の吸着量を測定した。その結果、クエン酸吸着量はクエン酸の処理濃度が高くなるほど増加し、クエン酸吸着量が増加するほど、その後の β

-LG 吸着量は減少する結果が得られた。

(2) 分子動力学法による食品汚れ(タンパク質)の吸着シミュレーション

①pH3.0 における β -LG の吸着状態シミュレーション

シミュレーションの間、 β -LG 分子は、金表面から約 0.2nm 離れた位置に安定して存在していた。したがって、 β -LG の吸着状態が再現されたものと考えられた。

金表面に対する β -LG 分子の吸着方向を反映するパラメータとして、Cys66 の S 原子、Cys106 の S 原子、Cys121 の α -C 原子の 3 原子から構成される平面と金表面がなす角度 θ を調べた。その結果、 θ はシミュレーションの間、ほぼ一定の値を示したことから、 β -LG は特定の部位を介して表面に吸着していることが明らかとなった。

図 7 にシミュレーションから得られた β -LG の吸着状態のスナップショットを示す。

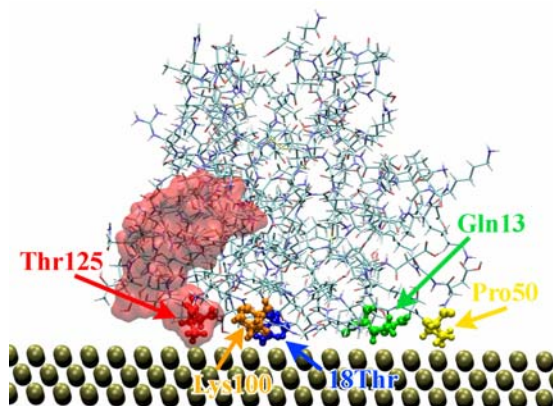


図 7 シミュレーションから求められた pH3.0 における β -LG の吸着状態のスナップショット. 赤い部分は、既往の研究により、ステンレス表面への吸着に関与していると考えられている部分である。

酸性条件下におけるステンレス鋼に対する β -LG 上の吸着部位は、ペプチド分解法や FT-IR を用いた既往の研究により、実験的に明らかとなっている(図 7 の赤い部分)。今回シミュレーションから求められた吸着部位は、その実測結果と近い結果となった。このことから、仮想的なステンレス表面としての電荷を有した金(100)結晶面、ならびその他のシミュレーション条件は、現実のステンレス鋼表面への吸着の近似となりうる可能性が示唆された。

また、金の表面電荷の値を変化させても、吸着部位は変化しなかったこと、吸着にはマイナスに帯電した酸性アミノ酸残基の側鎖が寄与するという既往の知見より、酸性条件下での β -LG の吸着は以下の(a)~(c)のよう

な機構で生じることが示唆された。

(a) ファンデルワールス相互作用を介して一時的な吸着が生じる。

(b) (a)の過程で、プラスに帯電した表面により表面近傍の酸性アミノ酸残基の側鎖の解離が誘発される。

(c) 酸性アミノ酸残基側鎖の解離により結果生じたプラス電荷とマイナスの表面電荷との間にはたらく静電的な引力により、吸着が強化される。

②pH7.0における β -LGの吸着シミュレーション

シミュレーションの間、 β -LG分子は、金表面から約0.2nm離れた位置に安定して存在していた。したがって、 β -LGの吸着状態が再現されたものと考えられた。また、シミュレーション中、 β -LGは二量体構造を維持した。

金表面に対する β -LG分子の吸着方向を反映するパラメータとして、Cys66のS原子、Cys106のS原子、Cys121の α -C原子の3原子から構成される平面と金表面がなす角度 θ を調べた。その結果、シミュレーション時間10ns以上で θ は一定の値に収束する傾向を示したことから、 β -LGは特定の部位を介して表面に吸着していることが明らかとなった。図8にシミュレーションから得られた β -LGの吸着状態のスナップショットを示す。

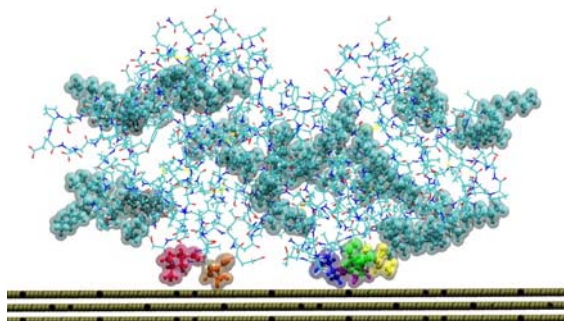


図8 シミュレーションから求められたpH7.0における β -LGの吸着状態のスナップショット。青い部分は、リジンならびにアルギニン残基を示す。

既往の研究により、負電荷を有する表面への吸着に寄与するアミノ酸残基は、正の側鎖電荷を有するリジン残基ならびにアルギニン残基であると考えられていた。しかしながら、今回のシミュレーションの結果からは、リジンまたはアルギニン残基が表面に近接している傾向が認められなかった(図8の青い部分)。このことから、リジンならびにアルギニン側鎖の正電荷は吸着に対する寄与は大きくないことが示唆された。

また、金表面と近接しているアミノ酸残基が属している二次構造を調べたところ、非繰返し構造(ターンまたはコイル)であった。この結果は、ステンレス鋼に対するタンパク質の吸着部位の予測をするうえで、有用な知見となる可能性を秘めていると考えられる。今後の他のタンパク質においても同様の結果が得られるのか検討する必要がある。

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)

① Tomoaki Hagiwara, Takaharu Sakiyama, and Hisahiko Watanabe, Molecular simulation of bovine β -lactoglobulin adsorbed onto a positively charged solid surface. Langmuir, 査読有, 25, 2009, 226-234.

[学会発表] (計3件)

① 萩原 知明・崎山高明, 分子動力学シミュレーションによる β -ラクトグロブリンの金属表面への吸着状態の解析, 化学工学会, 2010年9月8日同志社大学(京都市)。

② 北澤誠・萩原知明・崎山高明, 水晶振動子を用いたステンレス鋼平板に対するタンパク質の吸着特性の解析, 日本農芸化学会, 2010年3月29日, 東京大学(東京)。

③ 北澤誠, 萩原知明・崎山高明, 水晶振動子マイクロバランス法による金属表面に対するタンパク質吸着特性の解析, 日本食品工学会, 2009年8月1日, 石川県立大学(野々市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 知明 (HAGIWARA TOMOAKI)
東京海洋大学・海洋科学部・准教授
研究者番号: 20293095