卵白タンパク質のステンレス鋼表面に対する付着挙動

崎 山 高 明

東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科

Adhesion Behaviors of Egg White Proteins to Stainless Steel Surfaces

Takaharu Sakiyama

Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine
Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477

Adhesion behaviors of egg white proteins to stainless steel (SS) surfaces at pH7.4 and 30°C are reported. Ovalbumin and ovomucoid, acidic egg white proteins, were less adsorbed in the presence of phosphate (Pi), a multivalent anion, than in the presence of HEPES, an amphoteric ion. In contrast, lysozyme, a basic egg white protein, was more adsorbed in the presence of Pi than in the presence of HEPES. Citrate, another multivalent anion, and taurin, another amphoteric ion, affected the adsorption of these egg white proteins in a manner similar to Pi and HEPES, respectively. Based on the knowledge thus far obtained on the adhesion mode of several proteins to SS surfaces, these observations can be explained by assuming that small ionic substances precede proteins in attaching to SS surfaces, resulting in the alteration of effective surface charge. These findings could lead to the development of strategies for suppression of acidic egg white protein adhesion. (Accepted Feb. 17, 2012)

Keywords : egg white proteins, stainless steel surface, adhesion, cleaning**キーワード** : 卵白タンパク質, ステンレス鋼表面, 付着, 洗浄

1. はじめに

食品の製造工程では、その素材や製品そのもの、あるいはそれらの成分が製造機器の表面に付着する機会が多い。特に、卵白のように熱凝固しやすい食材が含まれ、加熱を伴った製造工程を経る場合、加熱面には著量の付着物が発生する。例えば、液卵はその製造工程において 60°C 程度の温度で加熱殺菌されるが、この加熱の際に殺菌器の加熱面にタンパク質が著量に付着して生産性を低下させる。タンパク質の機器表面に対する付着は、加熱した場合だけでなく、常温においても起こる¹⁾。いずれの状況で付着したタンパク質であっても、除去されずに機器表面に残れば、同じラインで製造される他の製品に混入する可能性がある。鶏卵は乳幼児を中心に患者数の多い食物アレルギー原因食材^{2,3)}であり、アレルギー性の高い卵白タンパク質が他の製品に混入すると、わずかな混入であっても食品衛生上の大きな問題となり得る。機器の洗浄操作を充分に行う必要が

あるのは勿論であるが、付着を抑制する技術を求める声も高い。付着抑制技術の開発には、タンパク質の付着機構の理解がその基礎として重要になる。

本稿では、鶏卵の主要アレルゲンである卵白タンパク質のステンレス鋼 (SS) 表面に対する付着特性について、演者らがこれまでに得た知見を紹介する。特に、将来的に卵白タンパク質の付着抑制法につながり得る一連の基礎研究の成果について解説する。

2. 卵白構成タンパク質の付着特性

オボアルブミン (OVA) を濃度 50 mmol/L, pH7.4 のリン酸 (Pi) 緩衝液または HEPES 緩衝液に溶解し、30°C において SS 表面に対する付着量を測定した結果⁴⁾を図 1 に示す。縦軸は付着量、横軸は緩衝液中のタンパク質濃度 (平衡濃度) である。この結果より、OVA の付着量は、タンパク質濃度だけでなく、緩衝液の種類にも依存することがわかる。HEPES 緩衝液中の付着量は縦軸に沿った急激な増加をみせた後、濃度の増加とともに吸着量が増加し、一定値に近づいていく。OVA の付着量が縦軸に沿うようにご

図1 ステンレス鋼表面に対するオボアルブミンの付着量 (pH7.4, 30°C).

2種類の緩衝液 (HEPES, Pi) 中で測定した結果を比較して示した.

図2 ステンレス鋼表面に対する (a) オボムコイド, (b) リゾチームの付着量の緩衝液の種類による差異 (pH7.4, 30°C).

初期タンパク質濃度は2mg/mlとした.

く低濃度の領域で急激に増加する現象は, チタン表面に対しても報告⁵⁾されており, OVA はこれらの金属表面に対して親和性が高いことがわかる. これに対してリン酸緩衝液中では, いずれのタンパク質濃度においても HEPES 緩衝液中よりも付着量が少なく, 付着量が縦軸に沿って急激な増加を示すこともなかった. すなわち, Pi の共存によって OVA の SS 表面に対する親和性は有意に低下するのである.

オボムコイド (OVM) についても 30°C, pH7.4 において SS 表面に対する付着量を測定したところ, OVA の場合と同様に, Pi 存在下の方が HEPES 存在下よりも付着量が少なかった (図 2a). OVA と OVM は弱酸性領域に等電点をもつという点で共通している. アルカリ性領域に等電点をもつリゾチーム (LYZ) についても同様に付着量を測定したところ, OVA や OVM とは逆に, Pi 存在下の方が

T5: ¹²⁵Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu-Glu-Lys¹³⁵
 T8: ⁹²Val-Leu-Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys¹⁰⁰
 T7: ⁷⁸Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys⁸³

図3 トリプシン処理により得られるβ-ラクトグロブリン由来ペプチド断片のステンレス鋼表面に対する付着性 (30°C).

HEPES 存在下よりも付着量が多かった (図 2b). 以上の結果をまとめると, タンパク質の等電点と共存塩との組み合わせによって SS 表面に対する付着挙動が異なることになる.

3. タンパク質のステンレス鋼表面付着機構に関する知見

タンパク質の付着量が共存塩の種類に何故依存するのか. この疑問に答えるためには, タンパク質の SS 表面に対する付着機構を理解する必要がある.

筆者らはこれまでに, 主に乳清タンパク質β-ラクトグロブリン (BLG) を対象として, タンパク質の SS 表面に対する付着挙動について各種の実験的解析を行ってきた. その結果, 常温でのタンパク質の SS 表面に対する付着には酸性アミノ酸残基の役割が大きいことが明らかになっている. その端緒は, タンパク質の分子表面に SS 表面に対して親和性の高い特定の部位が存在することを見出したことにある. この親和性の高い特定の部位とは, BLG をトリプシンで部分加水分解して得られるペプチド断片 T5 (図 3 参照)⁶⁾ に代表される部位である. ペプチド断片 T5 のように酸性アミノ酸残基を多く含むペプチドは, 図 3 に示すように, ペプチドそれ自体が SS 表面に対して高い親和性を示す. BLG だけでなく, ウシ血清アルブミンを部分加水分解することによっても, 酸性アミノ酸残基を多く含み, SS 表面に対して高い親和性を示すペプチド断片が得られる⁷⁾. また, これらのペプチドの酸性アミノ酸残基をアラニン残基に置換すると, 図 4 に示すように付着量が有意に低下す

Fragment 9 : Asp-Leu-Gly-Glu-Glu-His-Phe-Lys
 Fragment 9A : Ala-Leu-Gly-Ala-Ala-His-Phe-Lys
 Fragment 9B : Ala-Leu-Gly-Glu-Glu-His-Phe-Lys

図4 牛血清アルブミン (BSA) 由来ペプチド断片とそのアナログのステンレス鋼表面に対する付着性 (30°C).

ることも明らかになっている^{7,8)}。したがって、付着における側鎖カルボキシルの役割は極めて大きいものと推測される。また、ステンレス鋼表面に付着したBLGをプロテアーゼ処理しても、高親和性ペプチド断片T5を含む領域は付着したままSS表面から遊離しない⁹⁾。このことから、酸性アミノ酸残基の多い部位は、遊離ペプチドとして高い付着性を示すだけでなく、タンパク質分子内においても付着に寄与していると考えられる。さらに、酸性アミノ酸残基の多いペプチドがSS表面に付着した際にはペプチド内のカルボキシル基が解離した状態にあることが、赤外分光分析 (FT-IR) の結果として示された^{7,8)}。すなわち、付着したペプチドはSS表面上で負に荷電しているのである。

一方、SSは鉄を主成分としてクロムやニッケル等を含む合金である。その表面は内部よりもクロム含量が高く、クロムの水和オキシ酸化物 $\text{CrO}_x(\text{OH})_{2-x} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 主体の緻密な層で覆われている。これが不動態皮膜として内部への腐食の進行を防ぐ働きをする。このような金属酸化物表面を水溶液中に浸漬すると、水溶液のpHに応じて水素イオンの授受が起こる。このため、金属酸化物表面の荷電状態はpHによって変化する。有効電荷がゼロになるpH (等電点または荷電ゼロ点) が存在し、溶液のpHが等電点よりも高くなると負に、低くなると正に帯電する¹⁰⁾。食品機器素材としてよく用いられるSSの一つで316Lと呼ばれる鋼種の等電点はpH8.5との報告¹¹⁾がある。したがって、中性付近から酸性のpH条件下では、負に荷電したカルボ

図5 ステンレス鋼表面に対するオボアルブミンの付着量に及ぼす共存イオンの影響 (pH7.4, 30°C).
 初期タンパク質濃度は2mg/mlとした。

キシル基と正に荷電したSS表面とが静電的に引き合い、この引力が付着の重要な契機になるものと考えられる。

4. 卵白タンパク質の付着に及ぼす共存イオンの作用

以上の知見をもとに、2.で述べた卵白構成タンパク質の付着挙動を考察してみると、以下ようになる。OVAやOVMはBLGと同様に弱酸性領域に等電点をもつ。この場合、有効電荷は中性のpH条件下で負となっており、正に荷電したSS表面とは静電引力で引き合う。LYZのように等電点の高いタンパク質の場合には、中性のpH条件下で局所的には解離したカルボキシル基があっても、有効電荷は正となるため、正に荷電したSS表面との反発力が大きくなる。その結果として付着量は低下する。このように、付着量はタンパク質の等電点に依存することになるが、以上の議論によって説明できるのはHEPES緩衝液中での卵白構成タンパク質の付着特性のみである。

リン酸緩衝液中の付着特性は何故逆になるのであろうか。この疑問に対しては、緩衝液を構成するイオンがタンパク質より先にSS表面に吸着して表面電荷を変化させる、と考えると説明が可能になる。中性付近のpH条件下では、両性イオンであるHEPESが吸着してもSS表面の正電荷は変化を受けないが、多価陰イオンであるPiがSS表面に吸着すると、吸着状態によっては正味の表面電荷が正から負に変わる。このため、Pi存在下では負に荷電したOVAやOVMの付着が抑制され、正に荷電したLYZの付着が促進されるのである。

上記の仮説を検証するため、PiとHEPES以外に多価陰イオンとしてクエン酸、両性イオンとしてタウリンを用い、各々の存在下においてOVAの付着量をpH7.4にて測定した。結果を図5に示す。クエン酸存在下の付着量はPi存在下とほぼ同じであり、タウリン存在下の付着量はHEPES存在下とほぼ同じ付着量であった⁴⁾。さらに、本稿では結果を示していないが、事前にPiやクエン酸でSS表面を処理した後に水洗した場合、HEPES共存下でのOVA

付着量が低減することが別の実験で示されている。これはすなわち、多価陰イオンが、水洗しても脱離しないほど強固にSS表面に吸着することを示している。以上の結果、多価陰イオンはSS表面に吸着してOVA等の付着を阻害するという仮説の妥当性が示された。また、多価陰イオンによるSS表面の前処理が卵白タンパク質の付着抑制法として有望であることが示唆された。

5. おわりに

本稿では、卵白タンパク質の付着特性について解説した。特に緩衝液の種類の相違がもたらす大きな付着量の差異に着目し、なぜその差異が発生するのかという疑問に答えるべく、付着機構を含めて詳述した。その帰結として、多価陰イオンを用いたSS表面の前処理が卵白タンパク質の付着抑制法として有望であることも明らかにすることができた。実用的な卵白タンパク質付着抑制法とするためには、さらに様々な観点から検討を加える必要がある。今後も、各種前処理条件が付着抑制効果に及ぼす影響など、応用的な観点からも研究を深めていきたいと考える。

本研究は、岡山大学工学部生物機能工学科での基礎研究をもとに、東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科において展開されたものです。共同研究者として貴重なご意見を賜りました中西一弘岡山大学名誉教授（現中部大学）、今村維克岡山大学教授、渡辺尚彦東京海洋大学名誉教授、萩原知明准教授、研究に携わってくれた多くの学生の皆さんに感謝いたします。また、本研究の一部は、財団法人旗影会の研究助成を受けて行なわれたものであり、ご支援に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Nakanishi, K., Sakiyama, T. and Imamura, K., On the ad-

- sorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 233-244 (2001).
- 2) Bush, R. K. and Hefle, S. L., Food allergens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **36** (S), S119-S163 (1996).
 - 3) Stanley, J. S. and Bannon, G. A., Biochemistry of Food Allergens. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **17**, 279-291 (1999).
 - 4) Sugiyama, H., Hagiwara, T., Watanabe, H. and Sakiyama, T., Effects of ionic substances on the adsorption of egg white proteins to a stainless steel surface. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 467-472 (2012).
 - 5) Imamura, K., Shimomura, M., Nagai, S., Akamatsu, M. and Nakanishi, K., Adsorption characteristics of various proteins to a titanium surface. *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 273-278 (2008).
 - 6) Sakiyama, T., Tanino, K., Urakawa, M., Imamura, K., Takahashi, T., Nagai, T. and Nakanishi, K., Adsorption characteristics of tryptic fragments of bovine β -lactoglobulin on a stainless steel surface. *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 536-541 (1999).
 - 7) Sakiyama, T., Tomura, J., Imamura, K. and Nakanishi, K., Adsorption characteristics of bovine serum albumin and its peptide fragments on a stainless steel surface. *Colloids Surf. B.*, **33**, 77-84 (2004).
 - 8) Imamura, K., Kawasaki, Y., Awadzu, T., Sakiyama, T. and Nakanishi, K., Contribution of acidic amino residues to the adsorption of peptides to a stainless steel surface. *J. Colloid Interface Sci.*, **267**, 294-301 (2003).
 - 9) Sakiyama, T., Aya, A., Embutsu, M., Imamura, K. and Nakanishi, K., Protease susceptibility of β -lactoglobulin adsorbed on stainless steel surface as evidence of contribution of its specific segment to adsorption. *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 434-439 (2005).
 - 10) Parks, G. A., The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxo complex systems. *Chem. Rev.*, **65**, 177-198 (1965).
 - 11) Takahashi, K. and Fukuzaki, S., Cleanability of titanium and stainless steel particles in relation to surface charge aspects. *Biocontrol Sci.*, **13**, 9-16 (2008).

(平成24年2月17日受理)