ステンレス鋼表面からのタンパク質汚れの洗浄除去特性

The Mode of the Removal of Protein from Stainless Steel Surface by Cleaning Operation

福 崎 智 司*

Satoshi FUKUZAKI

Key Words: Cleanability of stainless steel, Surface charge density, Electrostatic interaction, Affinity for protein adsorption, Biofilm formation

1. はじめに

ステンレス鋼は、食品や医薬品、生化学品分野において、機械装置、タンク類、配管系、バルブ等の基材として広く用いられている。これは、ステンレス鋼がさびにくい鋼であることをはじめとして、加工性、強度、溶接性、経済性、無毒性等の点で他の材料にはない優れた特性を有していることにある。一方、同一の鋼種でありながら、また一定の平滑性を付与された表面であっても、使用環境や切削加工、表面仕上げ、前処理、溶接等の条件の違いによりステンレス鋼の最表面（不動態皮膜）の界面化学的特性は大きく変化する。その結果として、ステンレス鋼の汚染性や洗浄性の低下を招く場合がある^{1),2)}。

タンパク質のステンレス鋼への吸着は、汚れの吸着や洗浄と深く結びついた重要な現象である。タンパク質などの有機物の付着層は、細菌の栄養素となるばかりでなく、バイオフィーム形成の下地になる。水溶液中においてタンパク質がステンレス鋼表面に吸着する過程では、種々の分子間相互作用が働くことになる。特に、ステンレス鋼－タンパク質間に働く静電的相互作用は、タンパク質汚れの吸着親和性や洗浄除去特性を支配する作用力である³⁾。この静電的相互作用を理解することは、タンパク質の付着の抑制や最適な洗浄力要素の選択において基礎的かつ重要な情報を与えてくれる。金属材料の視点から言えば、ステンレス鋼最表面の極性の発現と静電的特性を理解しておくことが重要となる。

本稿では、オーステナイト系ステンレス鋼の微粒子を用いたモデル実験系で得られた筆者らの研究成果を中心に、洗浄効率に影響を及ぼす諸因子として、1) ステンレス鋼－水界面の特性、2) タンパク質の吸着相互作用、3) アルカリ（水酸化物イオン）の洗浄作用メカニズム、4) ステンレス鋼の熱履歴と洗浄性の関係について解説する。

2. ステンレス鋼－水界面の特性

ステンレス鋼の表面特性や耐食性は、表面に形成する酸化皮膜の物理的・化学的特性に依存する。酸化皮膜は、CrやFeの酸化物や（オキシ）水酸化物からなる非晶質構造であり、さらにその最表面には水の解離吸着によって形成した水酸基が存在しており、固相の一部を形成している⁴⁾。ここで、酸化物の格子の最前列にO²⁻が位置し、金属イオン(M)はその内側に位置する結晶表面の構造（二次元）を考える（Fig. 1）。表面は化学的に不均一であり、表面の酸素位置と金属位置によって形成される水酸基の解離特性も異なる。すなわち、水から解離した水酸基が1個の金属イオンに配位して形成された水酸基①は、金属イオンからの分極が弱いため水素を強く結合し、塩基性を示すようになる（1式）。一方、水から解離したH⁺と格子の酸素から形成され、2個の金属イオンに配位した水酸基②は、金属イオンの強い分極の影響で水素の結合力が弱く、酸性の性質を示す（2式）。

このように、ステンレス鋼の表面水酸基が水溶液中で水素イオン（H⁺）を吸・脱着することにより電荷を生じる。電位決定イオンは水素イオンH⁺と水酸化物イオン（OH⁻）

Fig. 1 A schematic representation of surface ionization of oxide layer

* 岡山県工業技術センター（〒 701-1296 岡山市北区芳賀 5301）

Industrial Technology Center of Okayama Prefecture (5301 Haga, Kita-ku, Okayama 701-1296, Japan)

Fig. 2 Apparent surface charge densities of stainless steel particles (SUS 316L) and net charge of protein (BSA) as a function of pH.

なので、電位差 (pH) 滴定法を用いてステンレス鋼-水相における H^+ と OH^- の表面濃度差 (H^+ の相対吸着量) を定量することにより表面電荷密度を測定することができる。Fig. 2A にステンレス鋼 (SUS 316L の微粒子試料で測定) の見掛けの表面電荷密度曲線を示す⁹⁾。正・負の電荷密度は、pH に依存して変化する。また、加熱処理や硝酸処理などの前処理により、ステンレス鋼の表面電荷特性は大きく変化することがわかる。ステンレス鋼の表面電荷特性や親水性度は、表面水酸基の性質や水酸化化度に支配されており、有機物汚れとの吸着相互作用と密接に関係している。ステンレス鋼の酸化皮膜は化学的・物理的に安定であるが、その最表面は極性であり、極性物質の吸着や脱着が起こる動的な反応場でもある。

3. タンパク質の吸着相互作用

食品製造機器 (機械、装置、器具等) の洗浄では、ステンレス鋼などの硬質表面に付着したタンパク質の洗浄除去が基本的な問題となっている。タンパク質は分子内にカルボキシル基 ($-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$) やアミノ基 ($-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons -NH_3^+$) 等を有する両性電解質である。タンパク質の電位決定イオンは H^+ または OH^- であり、実効電荷は水溶液の pH に依存して変化する (Fig. 2B)。

Fig. 3 A schematic drawing of three-layer model of a randomly coiled proteins adsorbed on solid surface

タンパク質がステンレス鋼-水界面に拡散移動し、互いの電気二重層が重なり合う領域まで接近すると、種々の分子間相互作用が働く。この近接した領域内で働く相互作用として、遠距離 (5 ~ 50 nm) では van der Waals 力、静電的相互作用、疎水性相互作用がある。二つの表面電荷の符号が異なるときは、強い引力が働き、同符号の場合は斥力が働く。“柔らかな”構造のタンパク質は、基質との静電的斥力にかかわらず基質表面に吸着することが知られている⁶⁾。また、近距離 (< 5 nm) で働く主な作用力には、双極子-双極子相互作用、イオン結合、水素結合、共有 (配位) 結合がある。タンパク質-ステンレス鋼に働く相互作用力は、上記の分子間力の総和で与えられるが、いずれが支配的となるかは、ステンレス鋼の不動態皮膜の化学組成や表面電荷密度によって大きく変化する。一般に、ステンレス鋼や氧化物に対するタンパク質の吸着の場合、分子鎖の酸性アミノ酸残基 (カルボキシル基等) が吸着に関与することが報告されており、複数のセグメントによる多点での水素結合や静電的相互作用 (イオン結合)、共有 (配位) 結合が不可逆吸着に寄与すると考えられている⁷⁻¹⁰⁾。

タンパク質などの高分子物質が吸着する場合、分子鎖のどこか一つのセグメントの吸着が分子全体の吸着を意味するので、多様な吸着形態をとることができる。一般に、タンパク質のような高分子物質でさえも、固体表面に対しては複数のセグメントを介して点接触で吸着し (train)、残りの分子鎖を溶液側に伸長する形態 (loop and tail) をとると考えられている (Fig. 3)¹¹⁾。また、タンパク質の吸着の場合、油膜 (疎水性) のように一面に拡張して付着する場合と異なり、吸着や洗浄における単位面積あたりの界面張力 (界面自由エネルギー) の増減がそれほど重要な因子とならない。そのため、タンパク質が親水性のステンレス鋼表面から脱着する洗浄過程は、静電的相互作用による斥力 (ポテンシャルエネルギーの増加) に基づいて説明できる¹²⁾。

Fig. 4 Effect of the pH of cleaning solution on the removal of proteins from stainless steel surfaces (SUS 304).

4. アルカリの洗浄作用メカニズム

水酸化物イオン (OH^-) は、タンパク質、多糖類、油脂類等の広範囲の有機性汚れに対して優れた溶解力を示すこと、さらに付着物質ならびにステンレス鋼表面に大きな負電荷を帯電させ吸着親和性を減少させることから、ステンレス鋼の洗浄では重要な洗浄力である。

4.1 平衡論

Fig. 4 に、水洗浄後にステンレス鋼 (SUS 304) 表面に残存した種々のタンパク質を対象に一定時間洗浄を行ったときの、洗浄液の pH と除去率の関係を示す¹³⁾。タンパク質の除去率は、いずれのタンパク質においても、アルカリ性の pH 領域、特に pH 11.0 ~ pH 13.5 の範囲において pH の増加 (OH^- 濃度の増加) とともに著しく向上する。一方、弱酸性~弱アルカリ性の範囲では、不可逆吸着したタンパク質はほとんど離脱しない。強酸性溶液では pH の減少とともに除去率はわずかに増加する傾向を示すが (離脱分子はステンレス鋼の溶解に起因する)、 OH^- の効果と比較すると洗浄効率は低い。また、強酸性溶液 (pH 1) での洗浄では、タンパク質の変性・凝集が起こり除去しにくい状態に変化する場合がある。

4.2 速度論

Fig. 5 に、タンパク質 (牛血清アルブミン: BSA) が吸着したステンレス鋼 (SUS 316L) を種々の濃度の水酸化ナトリウム溶液で洗浄 (40°C) したときの洗浄 (離脱) 曲線を示す¹³⁾。グラフは、洗浄時間に対して残存 BSA 量 (Γ) の自然対数値 ($\ln \Gamma$) をプロットしたものである。 OH^- 濃度が 0.01M (pH 12) から 0.3M (pH 13.5) に増加するとともに、離脱速度ならびに洗浄効率は著しく増加していることがわかる。筆者らは、洗浄速度を定量的に評価するために、吸着タンパク質分子の離脱が速度論的に 2 種類の機構

Fig. 5 Effect of NaOH concentration on the rate of desorption of protein (BSA) from stainless steel surfaces (SUS 316L).

(速い離脱と遅い離脱) で起こっていると仮定し、以下の離脱モデル式を誘導して解析に用いている¹⁰⁾：

$$\ln \Gamma = \ln \{ \exp(\ln \Gamma_0^f - k^f t) + \exp(\ln \Gamma_0^s - k^s t) \} \quad (3)$$

ここで、 t は洗浄時間、 Γ は時間 t でのタンパク質の残存量、 Γ_0 は $t=0$ での初発タンパク質濃度、 k は Γ に関する一次脱離速度定数、添え字 f と s は、各々速い離脱と遅い離脱を意味する。 k^f は洗浄初期の離脱速度を、 k^s は洗浄後期の離脱速度を反映する。

Fig. 5 の各測定点を結ぶ実線は、(3) 式と非線形最小二乗法を用いて解析した結果である。(3) 式を用いた解析の結果、水酸化ナトリウム濃度が 0.01M から 0.3M に増加すると、 k^f は 0.039 min^{-1} (0.01M) から 0.089 min^{-1} (0.3M) へ 2.3 倍増加し、 k^s は 0.0013 min^{-1} (0.01M) から 0.011 min^{-1} (0.3M) へ 8.5 倍増加すると概算される。

4.3 作用メカニズム

Fig. 6 に、 OH^- による洗浄除去メカニズムのモデル図を示す⁹⁾。強アルカリ性の OH^- 濃度が高い条件下では、 OH^- はタンパク質に吸着 ($=\text{H}^+$ の脱着) し、タンパク質分子鎖が負電荷を帯びることで水和、膨潤、溶解、分散が促進される。さらに、 OH^- は親水性のステンレス鋼表面にも吸着し、タンパク質とステンレス鋼の表面電荷がともに大きな負電荷を帯びるようになる。その結果、タンパク質との間に静電的斥力が起こることにより、吸着力が消失していき、離脱の方向に動的平衡が傾く。最終的には、タンパク質の吸着官能基の位置に OH^- が吸着し、離脱に至る。すなわち、ステンレス鋼-水界面では OH^- による吸着置換反応が洗浄の進行に重要な役割を果たしている。

4.4 硬質表面の電荷特性と洗浄性

ここでは、表面電荷特性の異なる 5 つの硬質表面としてシリカ (SiO_2 ; 石英)、アルミナ ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$)、316L ステン

Fig. 6 Mechanism of the removal of protein from stainless steel surfaces by the action of NaOH-.

Fig. 7 Apparent surface charge densities of stainless steel (SUS 316L), silica, alumina, and PET particles as a function of pH.

レス鋼（アセトン洗浄）、10% 硝酸処理 316L ステンレス鋼、ポリエチレンテレフタレート（PET）を用いた研究例を紹介する。

Fig. 7 に、各固体表面の見掛けの表面電荷密度曲線を示す¹⁴⁾。酸化物（ SiO_2 と Al_2O_3 ）およびステンレス鋼は、いずれも電気的に両性の性質を示しており、各々の零電荷点（ pzc_{app} ）は酸化物の種類や表面処理方法により大きく異なる。また、PET の場合は、分子鎖の一部に遊離のカルボキシル基が存在するため、表面はわずかに負電荷を帯びているが、その絶対値は酸化物やステンレス鋼と比較すると 1 ～ 2 桁低い値である。

Fig. 8 は、上記の硬質表面に対する pH5.0 でのタンパク質（BSA）の飽和吸着量（ Γ_{sat} ）と、タンパク質が飽和吸

Fig. 8 Amounts of protein (BSA) adsorbed on various solid surfaces at pH 5 and those remaining after cleaning with 0.1M NaOH solution.

着した各硬質表面を 0.1M NaOH 溶液で回分洗浄処理した後の残存量（ S_i ）を比較した結果である¹⁴⁾。概括的に言えば、吸着が起こった pH5.0 における正の電荷密度が小さい（ pzc_{app} の pH が酸性側に位置する）表面において Γ_{sat} が小さく、アルカリ性条件下で負の電荷密度が大きい表面において S_i が小さくなる（洗浄性が高い）傾向が見られる。例えば、2つのステンレス鋼（アセトン洗浄、硝酸処理）を比較すると、硝酸処理ステンレス鋼では Γ_{sat} は小さいが、 S_i は大きい。PET の場合、 Γ_{sat} はもっとも小さい値であるが、 S_i は比較的大きい。すなわち、 SiO_2 （石英）のように正の電荷密度が小さく、アルカリ性で負の電荷密度が大きくなる硬質表面が、BSA に対して抗付着性・易洗浄性を示す特性といえる。これは、タンパク質が負電荷のカルボキシル基を介して固体表面に吸着する傾向が強いことから、正電荷表面に対する吸着相互作用が強くなるためである。一方、負の電荷密度が小さい硬質表面は、 OH^- の吸着サイト数が少ないことになり、固液界面における静電的斥力と吸着置換作用が十分に作用しないことが、低洗浄性の原因である。

5. ステンレス鋼の熱履歴と洗浄性

ステンレス鋼を高温で加熱処理すると酸化皮膜中での Fe の濃縮、不動態皮膜中の水和物の酸化（酸化物層の形成）ならびに表面水酸基の縮合脱水が起こる。その結果、表面水酸化度の低い Fe_2O_3 を主体とする酸化皮膜が形成され

Fig. 9 Curves characterizing desorption of protein (BSA) from heat-treated stainless steel (SUS 316L) at various temperatures during cleaning with 0.1M NaOH solution.

る¹⁵⁾。このようなステンレス鋼の表面変化は、タンパク質に対する吸着親和性や洗浄性に変化をもたらす。さらに、700～850℃の鋭敏化温度域に一定時間保持されると、結晶粒界部や最表面においてクロム炭化物の生成や構成元素の偏析が起こる。実際、食品製造機器の配管の溶接継手部では、洗浄操作後の汚れの残留やバイオフィルムの形成がしばしば観察されており、一般部材表面と比較して洗浄性に劣ることが経験的に知られている^{1), 2)}。これは、溶接熱影響部において鋭敏化あるいは構成元素の偏析が起こり、表面化学組成の変化が起こった結果ではないかと推測されている。

5.1 加熱ステンレス鋼と洗浄性

Fig. 9 に、種々の温度で4時間加熱したステンレス鋼 (SUS 316L) にタンパク質 (BSA) を吸着させた後、0.1M 水酸化ナトリウム溶液で洗浄したときの洗浄曲線を示す¹⁵⁾。300℃以上で加熱処理したステンレス鋼では、温度に依存してタンパク質の離脱速度は緩慢となり、120分後の残存量も多い結果となる。(3)式を用いた解析の結果、加熱温度が100℃から500℃に増加すると、 k^f は 0.057 min^{-1} (100℃) から 0.047 min^{-1} (500℃) へ1.2倍減少し、 k^s は 0.0062 min^{-1} (100℃) から 0.041 min^{-1} (500℃) へ1.5倍減少すると概算される。洗浄性の低下は、ステンレス鋼表面のFeの濃縮およびアルカリ性領域での負電荷密度の減少と相関する変化であることが示されているが¹⁵⁾、詳細は明らかになっていない。

5.2 溶体化処理による洗浄性の改善

低炭素ステンレス鋼である SUS 316L (粒子) を用いて、疑似的に鋭敏化処理 (700℃で100時間保持後に急冷) を行うと、ステンレス鋼の表面にCr析出物の生成やMnの偏析が起こる。ここでは、洗浄性に及ぼす疑似鋭敏化 (偏析)

Fig. 10 Curves characterizing desorption of protein (BSA) from original, pseudo-sensitized, and solution-treated stainless steel (SUS 316L) during cleaning with 0.1M NaOH solution.

の影響と、溶体化処理 (1,050℃で1時間保持後に急冷) による回復効果について紹介する。

Fig. 10 に、疑似鋭敏化処理および溶体化処理ステンレス鋼にタンパク質 (BSA) を一定量吸着させた後、0.1M 水酸化ナトリウム溶液で洗浄したときの BSA の離脱曲線を示す¹⁶⁾。鋭敏化処理材では、タンパク質の離脱はきわめて緩慢であり、洗浄中期以降では離脱はほとんど起こっておらず、洗浄性は著しく低下していることがわかる。一方、この疑似鋭敏化処理ステンレス鋼を溶体化処理すると、表面のCr析出物ならびにMnOが粒内に固溶し、表面の化学組成ならびに表面電荷特性を元の未処理材の状態に戻すことができる (結果未掲載)。その結果、離脱速度および洗浄終了時 (120分) の残存量は、未処理材とほぼ同等なレベルまで改善することができている。(3)式を用いた解析の結果、鋭敏化処理材に対して得られた k^f と k^s (0.046 min^{-1} , 0.00018 min^{-1}) は、未処理材 (0.092 min^{-1} , 0.0059 min^{-1}) と比較すると、各々2倍および33倍も小さいと算出される。また、溶体化処理材に対して得られた k^f と k^s (0.099 min^{-1} , 0.0039 min^{-1}) は、未処理材とほぼ同等の数値となる。

6. おわりに

ここでは、アルカリ剤 (OH⁻) によるステンレス鋼表面からのタンパク質の除去特性を中心に概説した。従来、ステンレス鋼の汚染性や洗浄性については、耐食性や加工性を基準に鋼種や表面仕上げ (平滑性) の影響が検討されてきたが、不動態皮膜の化学組成および表面電荷特性という観点から解析した研究例は少ない。洗浄操作により、タンパク質などの付着層を除去することは、バイオフィルムの形成を防止するための基本的な対策である。効率のかつ有効な洗浄を実施するためには、種々の環境因子により、ステンレス鋼の界面化学的特性が変化し、洗浄性までもが変

化することを認識しておくことが重要である。

引用文献

- 1) European Hygienic Equipment Design Group: Trends Food Sci. Technol., **4** (1993) 306-310.
- 2) European Hygienic Equipment Design Group: Trends Food Sci. Technol., **4** (1993) 375-379.
- 3) 福岡智司：まてりあ、**43** (2004) 418-424.
- 4) S. Fukuzaki, A. Takehara, K. Takahashi, M. Hiramatsu, and K. Koike: J. Surface Finish. Soc. Jpn., **54** (2003) 1034-1042.
- 5) 福岡智司：ふえらむ、**12** (2007) 578-584.
- 6) K. Nakanishi, T. Sakiyama, and K. Imamura: J. Biosci. Bioeng., **91** (2001) 233-244.
- 7) S. Fukuzaki, H. Urano, and M. Hiramatsu: J. Surface Finish. Soc. Jpn., **49** (1998) 915-916.
- 8) T. Sakiyama, K. Tanino, M. Urakawa, K. Imamura, T. Takahashi, T. Nagai, and K. Nakanishi: J. Biosci. Bioeng., **88** (1999) 536-541.
- 9) H. Urano and S. Fukuzaki: J. Biosci. Bioeng., **90** (2000) 105-111.
- 10) H. Urano and S. Fukuzaki: J. Colloid Interface Sci., **252** (2002) 284-289.
- 11) 福岡智司、浦野博水：New Food Ind., **51** (2004) 92-97.
- 12) 福岡智司：冷凍、**77** (2002) 759-764.
- 13) 福岡智司：“フレッシュ食品の高品質殺菌技術”、サイエンスフォーラム (2008) 167-178.
- 14) 福岡智司：平成 18 年度都市エリア産官学連携推進事業共同研究報告書、(2007) 55-67.
- 15) K. Takahashi and S. Fukuzaki: Biocontrol Sci., **11** (2006) 61-68.
- 16) S. Fukuzaki, K. Takahashi, and A. Takagi: Biocontrol Sci., **13** (2008) 57-63.