

ステンレス鋼に付着したタンパク質汚れのアルカリ洗浄過程の速度論的解析

高橋和宏・福崎智司

Kazuhiro TAKAHASHI, and Satoshi FUKUZAKI

キーワード ステンレス鋼／タンパク質汚れ／洗浄の速度論／被覆率／洗浄温度

KEY WORDS Stainless steel／Proteinous soil／Kinetics of cleaning／surface coverage／Cleaning temperature

要 旨

ステンレス鋼表面に付着した牛血清アルブミン (BSA) の脱着過程に及ぼす被覆率 (θ) と洗浄温度の影響について、0.1M 水酸化ナトリウムを供給するプラグフローカラムを用いた洗浄実験により速度論的に解析した。洗浄時間に対して BSA 残存量の自然対数値をプロットした脱着曲線に、同時進行する 2 つの一次脱着反応を描写する積分型モデル式を適合させて解析した。それぞれの被覆率、洗浄温度において、BSA の脱着曲線は、異なる脱着速度で同時に進行する 2 つの一次脱着反応の和として表すことができた。速い脱着速度で脱着する BSA 分子 (BSA^f) の脱着速度定数 (k^f) は θ 依存性を示し、その依存性は $\theta > 0.6$ で顕著であった。一方、遅い脱着速度で脱着する BSA 分子 (BSA^s) の脱着速度定数 (k^s) は $\theta > 0.6$ でほぼ一定であった。 k^s は k^f より 10-20 倍低かった。また、 k^f はアレニウス型の温度依存性を示した。 k^f の見掛けの活性化エネルギー (E_a) は 33kJ/mol と推定された。 k^f は温度が 10°C 上昇する毎に、約 1.4 倍増加した。付着した BSA に占める BSA^s 分子の割合は洗浄温度の上昇に伴い減少した。

1 緒 言

食品産業において、洗浄工程は安全な製品の生産に重要である。これまで、食品と直接接する固体表面の洗浄は、様々な汚れ成分、洗浄剤、洗浄条件について研究されている^{1), 2), 3)}。洗浄効率は、加えられた洗浄力 (洗浄剤、洗浄用水、熱などの費用) だけではなく洗浄時間によっても左右されるため、洗浄の最適化には洗浄の速度論的解析が不可欠である。

Jennings¹⁾ はステンレス鋼表面からの牛乳汚れのアルカリ洗浄過程の研究を行った。彼のデータは洗浄初期の汚れの脱着過程において、汚れの脱着速度と洗浄剤の濃度の間に一次の関係があることを示している。一次の脱着速度定数はアレニウス型の温度依存性を示した。Bourne と Jennings^{4), 5)} は 0.03M 水酸化ナトリウム溶液によるステンレス鋼からのトリステアリン酸の非線形洗浄曲線の研究を行った。その結果、彼らはステンレス鋼表面には洗浄速度の異なる 2 種類のトリステアリン酸が付着しており、 각각の脱着が独立かつ同時に進行する一次脱着反応として表され、それぞれの脱着速度は 10-100 倍異なることを示した。また、Jennings⁶⁾ は、多くの洗浄曲

線が、2 種の汚れ成分の一次脱着反応の和として表されることを示し、この概念が、様々な汚れ、固体表面、そして様々な洗浄条件に適応できることを示した。

最近、我々は付着した単一成分からなる汚れが脱着速度論的に 2 種の汚れ成分に大別できるという概念をもとに一次脱着反応の積分型モデル式を確立した⁷⁾。このモデル式は、様々な吸着量 (被覆率 θ ; 吸着量/飽和吸着量) でアルミナ表面に付着したウシ血清アルブミン (BSA) のアルカリ洗浄曲線によく適合した。このモデル式による洗浄の速度論的解析は、洗浄効率の評価に応用できると考えられる。

本研究は、ステンレス鋼表面からの BSA のアルカリ洗浄に及ぼす θ と洗浄温度の影響を調べることを目的とした。BSA の洗浄曲線は、時間に対して BSA の残存量の自然対数値をプロットし、上記積分型モデル式を適合させ解析した。

2 実験方法

2.1 実験材料

被洗浄体として、(株)ニラコ製 SUS316L ステンレス

鋼粒子（比表面積 $0.4\text{m}^2/\text{g}$ 、 $8\text{--}10\mu\text{m}$ ）を用いた。モデル汚れとして、ナカライテスク（株）製、牛血清アルブミン（Fraction-V; lot M7G9556）を用いた。

2.2 タンパク質吸着粒子の調製

0.001 から 0.5g の BSA を 100ml の 10^{-3}M KNO_3 溶液に溶解し、0.1M HNO_3 にて pH5.2 に調整した。1g のステンレス鋼粒子に対して 5ml のタンパク質溶液を加え、ガラス製バイアル瓶に入れ、密栓後、振とう保温（ 40°C 、140rpm、2時間）した。吸着後、 $2300\times g$ で 5 分間遠心分離した後、上清を取り除いた。 10^{-3}M KNO_3 溶液で 2 回濯ぎ、 40°C で 16 時間乾燥した後、洗浄実験に用いた。

2.3 洗浄実験

タンパク質が吸着したステンレス鋼粒子 1g をステンレス製カラム（内径 4mm×長さ 50mm）に充填した後、各温度に設定した恒温槽内に垂直に設置した。まず定流量ポンプ（LC-9A；島津製作所（株）製）を用いて 10^{-3}M KNO_3 溶液（pH5.2）をカラム底部より $0.25\text{ml}/\text{min}$ の流速で送液し、リンスを行った（ 40°C ）。その後、0.1M NaOH 溶液を $0.25\text{ml}/\text{min}$ の流速で送液し、洗浄した（ $40\text{--}80^\circ\text{C}$ ）。カラム出口より排出されるリンス液および洗浄液を経時的に分取し、各分画中のタンパク質量を lowry-follin 法にて定量した⁸⁾。

2.4 洗浄の速度論的解析

付着した単一成分からなる汚れは、脱着速度論的に 2 種の汚れ成分に大別でき、それぞれが独立かつ同時に脱着するという概念に基づき作製されたモデル式：

$$\ln \Gamma = \ln \{ \exp(\ln \Gamma_0^f - k^f t) + \exp(\ln \Gamma_0^s - k^s t) \} \quad (1)$$

により解析した⁷⁾。ここで、 Γ 、 Γ_0^f 、 Γ_0^s はそれぞれ任意の洗浄時間（ t ）における BSA の吸着量、速い速度で脱着する BSA 分子（ BSA^f ）の初期吸着量、遅い速度で脱着する BSA 分子（ BSA^s ）の初期吸着量を意味する。 k^f 、 k^s は、それぞれ BSA^f 、 BSA^s の一次の脱着速度定数を意味する。

3 結果と考察

3.1 BSA の脱着過程の解析

図 1 に BSA の洗浄曲線（ $\theta=0.54$ ）を示す。式（1）の適合には、非線形最小二乗法を用いた。洗浄時間 0 は洗浄液（NaOH）がカラムの出口へ到達した時間を示す。洗浄曲線には、洗浄初期にリンス液と洗浄液が置換するための脱着誘導期が、その後、速やか脱着しする領域、緩やかに脱着する領域が存在した。

式（1）と非線形最小二乗法を用いた洗浄曲線の解析のためには、脱着誘導期のデータの除外と適切な初期値の設定が必要となる。図 1A は脱着誘導期の除去方法と初期値（ $k^{f,p}$ 、 $k^{s,p}$ 、 $\Gamma_0^{f,p}$ 、 $\Gamma_0^{s,p}$ ）の算出方法について示す。まず、速い脱着速度で脱着する領域に、データにそって破線（1）を引き、 $\ln \Gamma_0 (=0.52)$ となる点を仮の洗浄 0 時（ t_0^p ）とする。遅い脱着速度で脱着する領域に破線（2）を引き、 t_0^p との交点を $\ln \Gamma_0^{s,p}$ とする。 $\Gamma_0 = \Gamma_0^f + \Gamma_0^s$ より $\ln \Gamma_0^{f,p}$ が算出される。また破線（1）、（2）の傾きより $k^{f,p}$ 、 $k^{s,p}$ が算出される。

図 1B に非線形最小二乗による適合を行った結果を示す。実線は、適合の結果得られた洗浄曲線を示す。破線（f）と破線（s）は、 BSA^f 、 BSA^s の一次脱着反応を示す。 t_0 は得られた実線上の $\ln \Gamma_0 = 0.52$ となる点より算出される。これらの方法により洗浄を表す速度論的パラメータが算出された（ $k^f = 0.051\text{min}^{-1}$ 、 $k^s = 0.0058\text{min}^{-1}$ 、 $\Gamma_0^f = 0.94\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $\Gamma_0^s = 0.75\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $t_0 = 2.24$ 、重相関係数 $R = 0.9999$ ）。

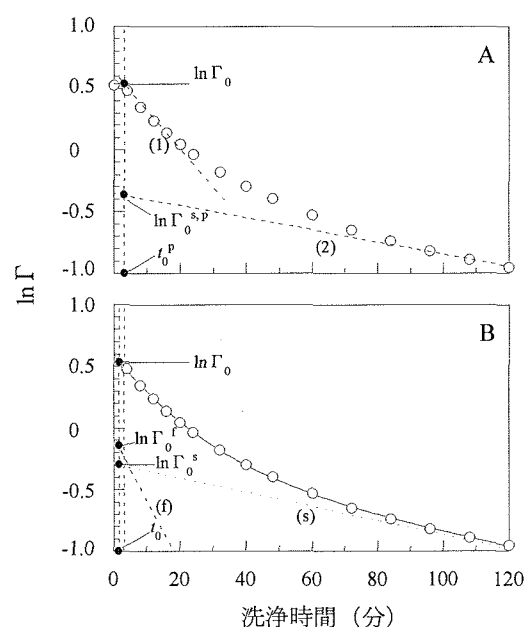


図 1 脱着誘導期の除去と初期値の算出方法（ $\theta=0.54$ ）(A) 初期値（ $k^{f,p}$ 、 $k^{s,p}$ 、 $\Gamma_0^{f,p}$ 、 $\Gamma_0^{s,p}$ 、 t_0^p ）の算出方法。(B) 式（1）と非線形最小二乗を用いた適合の結果。実線は適合の結果得られた洗浄曲線、破線（f）、（s）はそれぞれ算出された BSA^f と BSA^s の一次脱着反応を示す。

3.2 θ の影響

図 2 に $\theta=1.0$ 、0.69、0.38、0.21、0.10 で BSA が付着したステンレス鋼からのアルカリ洗浄曲線に式（1）を適合させた結果を示す。脱着誘導期を除くと、式（1）は高い適合性を示した（ $R>0.999$ ）。BSA の脱着過程が θ によらず、独立かつ同時に進行する 2 つ

の一次脱着反応の和として表されたことより、ステンレス鋼表面に付着した BSA 単一成分からなる汚れが、脱着速度という観点から見ると 2 つの成分（速い速度で脱着する BSA^f; BSA^f、遅い速度で脱着する BSA^s; BSA^s）に大別できることが明らかとなった。

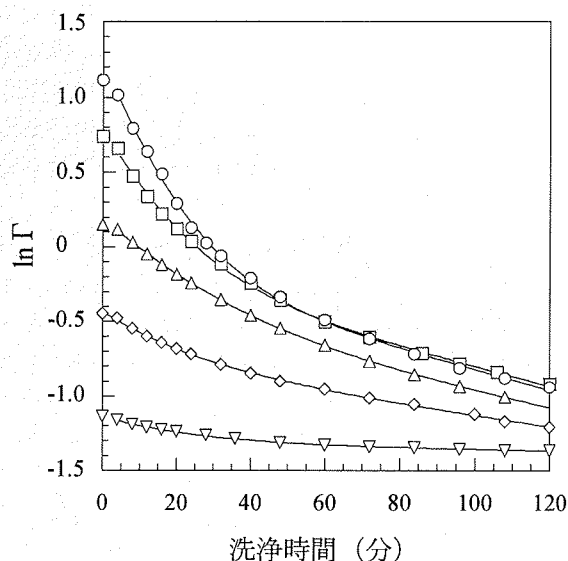


図2 様々な被覆率 (θ) で付着した BSA の 0.1M NaOH (40°C) による洗浄曲線 (洗浄液 0.25ml/min で送液)。シンボル; ○、 $\theta=1.0$; □、 $\theta=0.69$; △、 $\theta=0.38$; ◇、 $\theta=0.21$; ▽、 $\theta=0.10$ 。

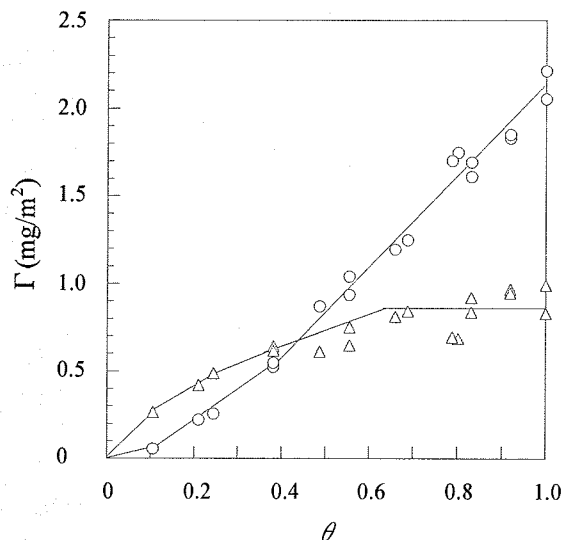


図3 算出された Γ_0^f と Γ_0^s と θ との関係。シンボル; ○、 Γ_0^f ; △、 Γ_0^s 。

図3に θ と算出された Γ_0^f 、 Γ_0^s との関係について示す。 θ が 0.11 から 1.0 に増加するにつれ Γ_0^f は 0.06 から 2.2 mg/m² まで θ に比例して増加した。それに対して Γ_0^s は、低 θ 領域 ($\theta < 0.6$) では θ に依存して増加するが、 $\theta > 0.6$ の領域ではほぼ一定 (0.86 ± 0.10 mg/m² (平均値 $\pm$ 標準偏差)) となった。 θ が 0.11 から 0.38 の範囲ではステンレス鋼表

面へ付着した BSA 分子は BSA^s 分子の割合が高かった。

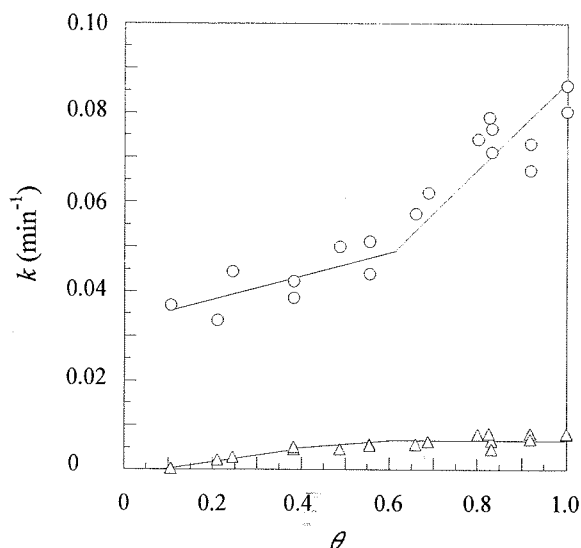


図4 k^f 、 k^s と θ との関係。シンボル; ○、 k^f ; △、 k^s 。

図4に θ と算出された k^f 、 k^s との関係を示す。 k^f は θ の増加と共に緩やかに増加し、 $\theta > 0.6$ で急激な増加を示した。 k^s は $\theta < 0.6$ の範囲では k^f と同様に緩やかな増加を示すが、 $\theta > 0.6$ でほぼ一定 (0.0071 ± 0.0012 min⁻¹) となった。また、 k^s は k^f より約 10-20 倍低かった。

NaOH により供給された OH⁻ イオンは、固体表面とタンパク質の両方に吸着する。その結果、両者共に負に帯電し、タンパク質分子内、タンパク質分子間、あるいはタンパク質-固体表面間に静電的斥力が生じ、タンパク質が離脱する³⁾。タンパク質の脱着速度 (k^f 、 k^s) はタンパク質-固体表面間の結合力により決定される。

一般的に BSA は 2 つあるいはそれ以上の種類の配向で吸着していると考えられている (例えば、直立配向や側面配向)^{9)、10)}。アルミナ表面への BSA の吸着挙動に関するこれまで研究において、 $\Gamma_0^f \cdot k^f$ と θ の関係について本実験の結果 (図3、4) と同様の結果が得られている^{7)、11)}。これらの結果は、アルミナ表面に吸着した BSA 分子の吸着形態の変化が、 θ に依存した k^f の急激な上昇をもたらすことを示唆している。アルミナ表面への BSA の吸着等温線と同様に、ステンレス鋼表面への BSA の吸着等温線にも、 $\theta = 0.8$ 付近に小さなステップが存在すること、ステップより高 θ 側で、BSA とステンレス鋼表面の間のイオンペアの相対数が減少することを確認している¹²⁾。これらの結果は、ステンレス鋼表面に BSA が一定濃度以上吸着すると吸着形態の変化が起こることを示唆する。

一方、 $\Gamma_0^s \cdot k^s$ の θ 依存性は $\Gamma_0^f \cdot k^f$ に比べて低い (図3、4)。このことは BSA^s の方が BSA^f よりステ

ステンレス鋼表面との関係が強いことを示唆する。

また、タンパク質が表面に吸着した後、吸着形態が変化することも確認されている^{13), 14), 15)}。この吸着形態変化も、BSA 分子と表面との間の結合力に分布が生じる要因の一つである。BSA とステンレス鋼表面の間の結合力は、吸着形態 (吸着に関与している吸着サイト数)、ステンレス鋼表面の不均一性に依存する。BSA の脱着が速度論的に 2 つの成分 (BSA^f・BSA^s) に大別されたのは、上記の複合的要因によりタンパク質-表面間の結合力に分布が存在するためだと考えられる。

3.3 洗浄温度の影響

図 5 にステンレス鋼表面からの BSA の脱着に及ぼす洗浄温度の影響について示す ($\theta=0.86$)。洗浄温度が高いほど脱着速度は増加する。実線は、式 (1) を非線形最小二乗法により適合させた結果得られた洗浄曲線を示す。式 (1) は、様々な温度で洗浄することにより得られた BSA 脱着曲線に対してもよく適合した ($R=0.9985$ から 0.9996)。

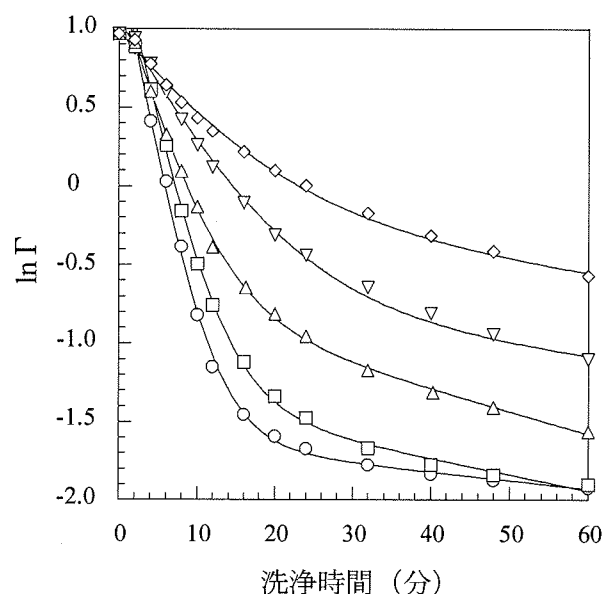


図 5 ステンレス鋼表面からの BSA の脱着に及ぼす洗浄温度の影響 (0.1M NaOH、洗浄液 0.25ml/min で送液)。シンボル; ◇、40℃; ▽、50℃; △、60℃; □、70℃; ○、80℃。

表 1 に図 5 より算出された洗浄の速度論的パラメータについて示す。 Γ_0^f は、洗浄温度の上昇に伴い増加した。一方 Γ_0^s は、温度の上昇に伴い減少し、80℃で洗浄を行った場合 8%にまで低下した。これらの結果は Γ_0^f/Γ_0^s が洗浄温度に依存することを示している。また、 k^f は洗浄温度が上昇するにつれ増加した。洗浄温度が 50℃から 70℃の場合の k^f は、40℃の場合より高い値を示すが、明確な温度依存性は示さなかった。

表1 洗浄曲線より算出された洗浄の速度論的パラメータ

洗浄温度 (℃)	BSA ^f		BSA ^s	
	Γ_0^f (mg/m ²)	k^f (min ⁻¹)	Γ_0^s (mg/m ²)	k^s (min ⁻¹)
40	1.97	0.069	0.66	0.006
50	2.01	0.122	0.62	0.011
60	2.21	0.176	0.42	0.011
70	2.38	0.240	0.25	0.010
80	2.42	0.280	0.21	0.006

すべてのデータは2回の実験の平均値を示す。

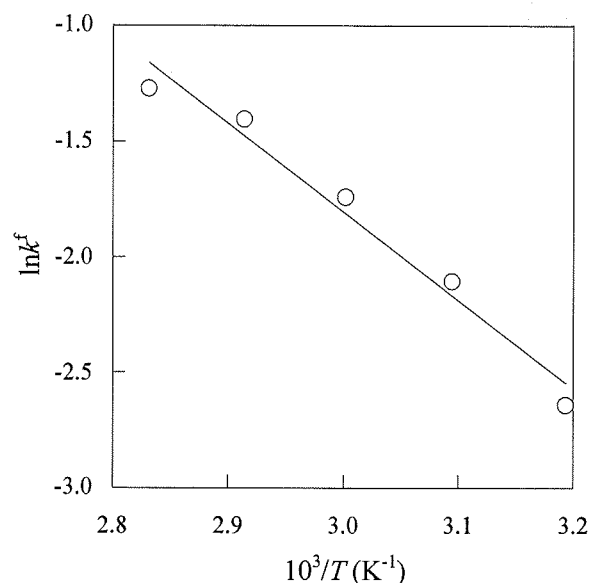


図 6 k^f のアレニウスプロット。洗浄条件は図 5 と同様。

図 6 に k^f と洗浄温度の関係をアレニウスプロットにより調べた結果を示す。

$$\ln k^f = -E_a / RT + \ln A \quad (2)$$

ここで E_a は見かけの活性化エネルギー (kJ/mol)、 R は気体定数 (8.316J/K・mol)、 T は温度 (K)、 A は頻度因子 (min⁻¹) である。 $\ln k^f$ と $10^3/T$ の間に直線関係が認められ、 E_a と A はそれぞれ 33 kJ/mol、 2.8×10^4 min⁻¹ となった。これらの値を 2 式に代入すると、 k^f 値はそれぞれ 0.074 min⁻¹ (40℃)、0.110 min⁻¹ (50℃)、0.161 min⁻¹ (60℃)、0.229 min⁻¹ (70℃)、0.319 min⁻¹ (80℃) であった。温度が 10℃上昇する毎に k^f 値は約 1.4 倍になった。一般的にアルカリによるタンパク質汚れの洗浄性は、洗浄温度の上昇に伴い向上する^{1), 16), 17)}。Jennings¹⁾ はステンレス鋼表面に付着した牛乳汚れに対するアルカリ洗浄の洗浄初期の脱着速度定数の温度依存性について研究を行い、一次脱着速度定数がアレニウス型の温度依存性を示し、10℃洗浄温度が上昇すると洗浄速度が約 1.6 倍上昇することを報告している。今回得られた結果は

4 まとめ

ステンレス網に吸着した BSA のアルカリ洗浄過程を非線形最小二乗法による積分型モデル式の適合により解析した。被覆率・洗浄温度によらずモデル式は洗浄曲線に良く適合した。洗浄温度が 10℃上昇すると k_f 値が約 1.4 倍増加した。 k_f 値には明確な温度依存性が見られなかった。本方法を用いることにより、洗浄を定量的に評価するための速度論的パラメータを算出することが出来る。

参考文献

- 1) Jennings, W. G. : *J. Dairy Sci.*, **42**, 1763-1771. (1959)
- 2) Dunsmore, D. G., Twomey, A., Whittlestone, W. G., and Morgan, H. W. : *J. Food Prot.*, **44**, 220-240 (1981)
- 3) Koopal, L. K. *Neth. Milk Dairy J.*, **39**, 127-154 (1985)
- 4) Bourne, M. C. and Jennings, W. G. : *Nature*, **197**, 1003-1004 (1963)
- 5) Bourne, M. C., and Jennings, W. G. : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 517-523 (1963)
- 6) Jennings, W. G. : In *Advances in Food Research*, vol. 14, Academic Press, Inc., New York. 325-458 (1965)
- 7) Urano, H. and Fukuzaki, S. : *J. Colloid Interface Sci.*, **252**, 284-289 (2002)
- 8) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 9) Fair, B. D. and Jamieson, A. M. : *J. Colloid Interface Sci.*, **77**, 525-534 (1980)
- 10) Norde, W. and Lyklema, J. : *J. Colloid Interface Sci.*, **66**, 257-265 (1978)
- 11) Urano, H. and Fukuzaki, S. : *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 105-111 (2000)
- 12) Fukuzaki, S., Urano, H., and Hiramatsu, M. : *J. Surface Finishing Jpn.*, **49**, 1237-1238 (1998)
- 13) Norde, W. and Giacomeli, C. E. : *J. Biotechnol.*, **79**, 259-268 (2000)
- 14) Kondo, A., Oku, S., and Higashitani, K. : *J. Colloid Interface Sci.*, **143**, 214-221 (1991)
- 15) Wahlgren, M. and Arnebrant, T. : *Trends in Biotechnol.*, **9**, 201-208 (1991)
- 16) Graßhoff, A. : *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.*, **40**, 139-177 (1988) (in German)
- 17) Takahashi, K. and Fukuzaki, S. *Biocontrol Sci.*,