

УДК 544.725.7:637.142.2

Кочкодан В. М.

ВПЛИВ ХІМІЧНОЇ ПРИРОДИ ПОВЕРХНІ ПОЛІМЕРНИХ МЕМБРАН НА ЇХ ЗАБРУДНЕННЯ БІЛКАМИ МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ

Досліджено схильність до забруднення білками молочної сироватки ультрафільтраційних поліефірсульфонової P010 та целюлозної C010 мембран, поверхня яких модифікована за допомогою фотохімічного прищеплення мономерів різної хімічної природи: 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфонової кислоти, 2-гідроксіетилметакрилату і кватернізованого 2-(диметиламіно)етил метакрилату, а також іммобілізації протеази. Показано, що електрохімічні та гідрофільно-гідрофобні властивості поверхні мембран істотно впливають на їхнє забруднення білками. Встановлено, що при ультрафільтрації молочної сироватки найвищою продуктивністю характеризуються мембрани з іммобілізованою протеазою. Це пояснено здатністю іммобілізованого ферменту розщеплювати білкові макромолекули, які акумулюються на поверхні мембрани, що дає змогу зменшити її забруднення при фільтруванні.

Ключові слова: ультрафільтрація, сироватка, забруднення мембран, протеаза.

Вступ

Основною проблемою при використанні ультрафільтрації (УФ) для концентрування та очищення розчинів у біотехнології та харчовій промисловості є забруднення мембран білковими речовинами, що призводить до різкого падіння продуктивності мембранних елементів та необ-

хідності їхньої дочасної заміни [1]. Один із підходів до зменшення забруднення мембран при УФ білкових розчинів полягає у підвищенні гідрофільності поверхні мембран, для чого застосовують фотохімічну прищеплену полімеризація гідрофільних мономерів [3; 14; 16], сорбцію поверхнево-активних речовин та полімерів [5; 13], обробку низькотемпературною плазмою [6;

9]. Іншим підходом до мінімізації білкового забруднення мембран є надання їм протеолітичної активності, тобто здатності каталітично розщеплювати макромолекули білків, що забруднюють поверхню [1]. Проте досі не зіставлено відмінні властивості різних модифікованих мембран на реальних полікомпонентних білкових системах.

Метою роботи було отримати ультрафільтраційні мембрани із різною хімічною природою поверхні за допомогою прищепленої полімеризації вінільних мономерів й іммобілізації ферменту протеази та порівняти схильність до забруднення одержаних зразків при УФ реальної полікомпонентної білкової системи – молочної сироватки. Молочна сироватка є побічним продуктом виробництва сиру і містить переважну частину розчинених мінеральних солей, вуглеводів молока, а також близько 25 % усіх молочних білків [4]. Приблизно 9 % сироватки, що виробляється у світі, сьогодні обробляють за допомогою УФ для отримання білкових концентратів та зменшення об'ємів стічних вод [8]. Разом із тим забруднення мембран компонентами молочної сироватки і насамперед сироватковими білками є актуальною проблемою [12].

Матеріали та методи

Для модифікування використовували ультрафільтраційні мембрани P010 з полієфірсульфону (ПЕС) та регенованої целюлози C010 від Microdin-Nadir GmbH (Німеччина) з межею молекулярно-масового затримання 10 кДа.

Мембрани з різною хімічною природою поверхні отримували при фотоініційованій прищепленій полімеризації 2-гідроксіетилметакрилату (ГЕМА), 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфонової кислоти (АМПС) і 2-(диметиламіно)етилметакрилату, метилхлорид кватернізованої солі (кДМАЕМ) на поверхні P010 і C010 мембран за методикою, описаною раніше [2]. Ступінь модифікування (СМ) мембран визначали за різницею між масою мембрани з прищепленим полімерним шаром та її масою до модифікування.

Для іммобілізації використовували фермент протеазу, яка характеризується високою протеолітичною активністю до білків молочної сироватки [7]. Методика іммобілізації ферменту на поверхні мембран та визначення кількості іммобілізованого ферменту описані в роботі [1].

Для частини мембранних зразків іммобілізовану на їхній поверхні протеазу зшивали за допомогою глютарового діальдегіду. Для цього мембрани витримували в 1–4 %-му водному розчині діальдегіду протягом 2–4 год. та промивали фосфатним буфером і дистильованою водою, щоб вилучити з поверхні мембрани залишки зшивального агента та неіммобілізованого ферменту.

Протеазу (Е.С. 3.4.24.39) з активністю 20 000 од./мг та решту мономерів і реактивів отримано від Sigma-Aldrich. У роботі використовували молочну сироватку ТМ «Слов'яночка» такого хімічного складу: сухі речовини 5,0–5,5 %, білки 0,8–1,2 %, лактоза 3,2–3,8 %, мінеральні солі 0,5–0,8 %, рН 4,8–5,0.

При УФ молочну сироватку з ємності об'ємом 5 дм³ при робочому тиску 100 кПа подавали в мембранну комірку ФМ-200 (Пластмаш, Хуст, Україна). Швидкість перемішування розчину в мембранній комірни становила 280 об./хв. Час фільтрування змінювали від 1 до 60 хв. Для підтримання постійної температури сироватку термостатували в термостаті BWT-U.

Продуктивність мембран при УФ визначали за формулою:

$$J = V/S,$$

де J – продуктивність мембрани (дм³/м²год.), V – об'єм пермеату (дм³), який пройшов крізь мембрану площею S (м²) за час τ (год.) при робочому тиску ΔP (кПа).

Вимірювання ξ -потенціалів модифікованих мембран проводили за допомогою електрокінетичного аналізатора поверхні ЕКА (Anton Paar GmbH, Австрія) у проточній мембранній комірни в 0,001 М КС1 при температурі 20 ± 1 °С.

Крайові кути змочування мембран визначали за методом сидячої краплі [15] за допомогою цифрової фотокамери Panasonic DMC-FX50. Величини крайових кутів змочування усереднювали вибіркою з 5 значень, визначених при різній локалізації на поверхні мембрани.

Результати та обговорення

У процесі зміни проведення фотоініційованої прищепленої полімеризації ГЕМА, АМПС, кДМАЕМ та іммобілізації протеази отримано модифіковані мембрани з різними величинами прищеплення відповідних кополімерів (100–920 мкг/см²) та завантаженням іммобілізованого ферменту (2–400 мкг/см²) на поверхні мембран [1; 2].

Для характеристики модифікованих мембран визначені їхні крайові кути змочування і ξ -потенціали поверхні. Як видно з рис. 1, модифіковані ГЕМА і АМПС мембрани характеризуються меншими кутами змочування порівняно з вихідною ПЕС мембраною (кут змочування 68°), що свідчить про гідрофілізацію її поверхні. Кути змочування мембранних зразків зменшуються зі збільшенням величини СМ, що, очевидно, пояснюється повнішим і рівномірнішим покриттям поверхні нанесеним полімерним шаром.

Встановлено, що ξ -потенціали композиційних мембран, модифікованих речовинами різної

хімічної природи, істотно відрізняються. Як видно з рис. 2, для мембрани із прищепленим полі(ГЕМА) в широкому діапазоні рН характерний незначний заряд поверхні, тоді як модифіковані полі(АМПС) або полі(кДМАЕМ) мембрани мають відповідно досить високі негативний і позитивний заряди поверхні. Для мембрани з іммобілізованою протеазою залежність ξ -потенціалу від рН визначається відповідною зміною знаку заряду макромолекул ферменту в розчині, враховуючи, що ізоелектрична точка (ІЕТ) ферменту становить 8,4 [11].

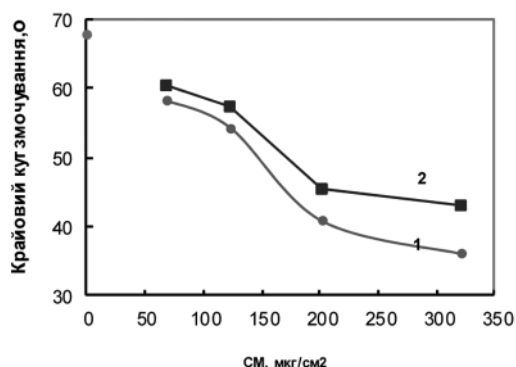


Рис. 1. Залежність крайового кута змочування мембрани Р010 при її модифікуванні кДМАЕМ (1) та АМПС (2)

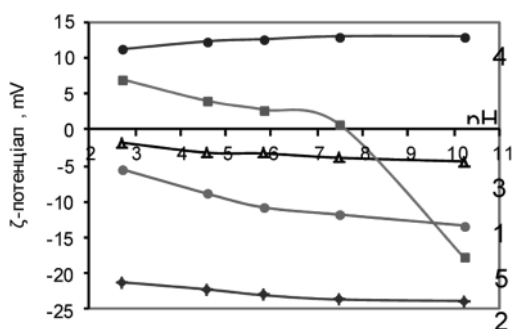


Рис. 2. Залежність ξ -потенціалу від рН розчину для вихідної ПЕС мембрани Р010 (1) та мембран, модифікованих АМПС (2), ГЕМА (3), кДМАЕМ (4), та іммобілізованою протеазою (5); 0,001 М КС1, температура 20 ± 1 °С

Показано, що забруднення мембран білковими речовинами, як правило, починається з їхньої адсорбції на поверхні мембран [10]. Одержані дані з адсорбційного забруднення модифікованих мембран компонентами молочної сироватки в статичних умовах (без використання робочого тиску) наведені на рис. 3.

Як видно на рисунку, найбільше зниження продуктивності після контакту з молочною сироваткою спостерігали для вихідної ПЕС мембрани і мембрани, яка модифікована полі(АМПС), менш схильними до забруднення виявилися модифіковані полі(кДМАЕМ) та полі(ГЕМА) мембрани, а найменш забруднювалася в адсорбційних експериментах мембрана з іммобілізованою протеазою.

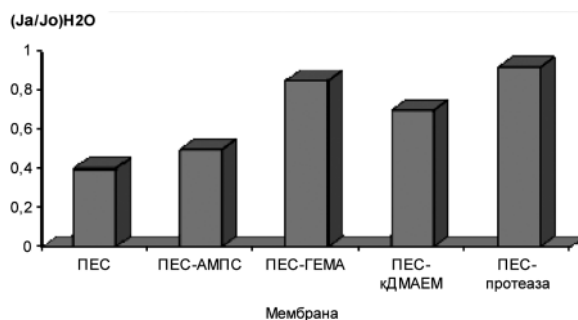


Рис. 3. Відносна продуктивність мембран після їх статичного контакту з молочною сироваткою протягом 3 год. при температурі 20 °С. J^a та J^b – продуктивності мембран стосовно води після та до адсорбційних експериментів відповідно

Висока схильність до забруднення компонентами молочної сироватки вихідної ПЕС мембрани, очевидно, пов'язана з її гідрофобністю, тоді як щодо модифікованої АМПС мембрани адсорбційному забрудненню поверхні, ймовірно, сприяють електрохімічні взаємодії між негативно зарядженими сульфогрупами прищепленого полімеру і функціональними групами сироваткових білків, зокрема лактоглобуліну, макромолекули якого позитивно заряджені при рН молочної сироватки 4,8 (табл. 1).

Таблиця 1. Фізико-хімічні характеристики основних білків молочної сироватки [17]

Білок	Концентрація, г/дм ³	Молекулярна маса, Да	ІЕТ
Лактоглобулін	2,7	18362	5,2
Лактальбумін	1,2	14147	4,5–4,8
Імуноглобуліни	0,65	150000–1000000	5,5–8,3
Бичачий альбумін	0,4	69000	4,7–4,9
Лактоферин	0,1	78000	9,0
Лактопероксидаза	0,02	89000	9,5

Щодо модифікованої кДМАЕМ мембрани, очевидно, електростатичне відштовхування між позитивно зарядженими макромолекулами сироваткових білків і четвертинними амонієвими групами прищепленого полімерного шару призводить до зменшення адсорбційного забруднення мембрани.

Як видно з рис. 3, досить стійкою до забруднення молочною сироваткою у статичних умовах виявилась мембрана з прищепленим полі(ГЕМА), поверхня якої має нейтральний гідрофільний характер. Найімовірніше, сильна гідратація модифікованої поверхні цієї мембрани перешкоджає адсорбції на ній компонентів молочної сироватки. Також дуже мало забруднювалася в адсорбційних експериментах мембрана з іммобілізованою протеазою. Це можна пояснити як електрохімічним відштовхуванням між позитивно зарядженими макромолекулами сироватки

Таблиця 2. Краєві кути змочування модифікованих мембран до і після адсорбційних та ультрафільтраційних експериментів із молочною сироваткою. Тривалість статичного контакту зразків мембран з сироваткою 3 год. Тривалість циклу УФ сироватки становила 1 год. при робочому тиску 100 кПа

Тип мембрани	ПЕС, °	ПЕС + АМПС, °	ПЕС + ГЕМА, °	ПЕС + κДМАЕМ, °	ПЕС + протеаза, °
Вихідна	68 ± 5	42 ± 4	36 ± 4	46 ± 3	54 ± 5
Після адсорбції сироватки	52 ± 3	51 ± 3	38 ± 3	50 ± 5	53 ± 4
Після УФ сироватки	54 ± 3	56 ± 5	51 ± 4	56 ± 4	55 ± 3

кових білків й іммобілізованого ферменту, так і здатністю протеази до гідролізу білкових макромолекул, які сорбуються на поверхні мембрани.

Додатковим підтвердженням адсорбції білкових компонентів сироватки на поверхні вихідної ПЕС мембрани та мембран, модифікованих АМПС і κДМАЕМ, може слугувати зміна їх кутів змочування після адсорбції (табл. 2). Для мембран із прищепленим полі(ГЕМА) та іммобілізованою протеазою крайові кути змочування до і після контакту із сироваткою майже не змінилися, що свідчить про відсутність значної адсорбції сироваткових білків на поверхні цих мембран. Варто зазначити, що після УФ сироватки крайові кути змочування були майже однаковими (54–56°) для всіх зразків мембран (табл. 2), що свідчить про формування на їхній поверхні шару або гелю з білкових компонентів.

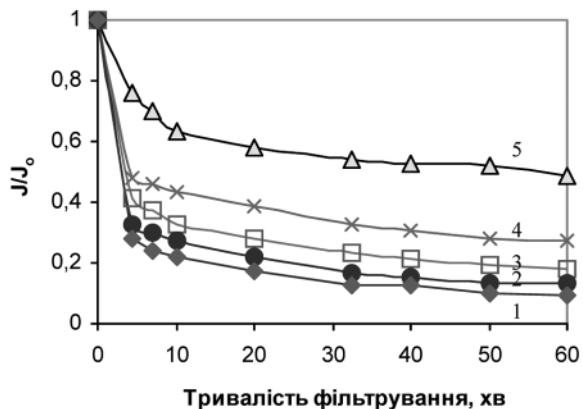


Рис. 4. Залежність відносної продуктивності від часу УФ молочної сироватки вихідної ПЕС мембрани P010 (1), зразків, які модифіковані ГЕМА (2), АМПС (3), κДМАЕМ (4) при СМ 180 ± 20 мкг/см², та мембрани з іммобілізованою протеазою (100 мкг/см²) (5). Температура 20 °С, рН 4,8, робочий тиск 100 кПа. J_0 та J – продуктивності мембран на початку та в процесі фільтрування відповідно

Як видно з рис. 4, при УФ молочної сироватки відносна продуктивність мембран поступово зменшується з часом фільтрування, що також підтверджує припущення про формування забрудненого шару з компонентів сироватки на поверхні мембран. Для вихідної ПЕС мембрани і модифікованого АМПС зразка спостерігали значне зниження продуктивності порівняно з мембранами з прищепленими κДМАЕМ і особливо

ГЕМА. Таким чином, результати, одержані при УФ сироватки, досить добре корелюють з даними статичного адсорбційного забруднення досліджуваних мембран.

На відміну від композиційних мембран, отриманих за допомогою прищепленої полімеризації, мембрана з іммобілізованою протеазою характеризувалась майже вдвічі вищою відносною продуктивністю при УФ молочної сироватки (рис. 4, крива 5). Найвірогідніше, це пов'язано із протеолітичною активністю такої мембрани, тобто здатністю іммобілізованого ферменту розщеплювати високомолекулярні білкові компоненти, які під час фільтрування накопичуються на поверхні мембрани та забруднюють її, до низькомолекулярних амінокислот і пептидів, що характеризуються нижчою забруднювальною здатністю. Отже, мембрана з іммобілізованим ферментом здатна до своєрідного «самоочищення» під час роботи.

Таблиця 3. Вплив хімічної природи поверхні мембран на їх показники при УФ молочної сироватки та після промивання водою. Робочий тиск 100 кПа, температура 20 °С

Тип мембрани/ступінь модифікування, мкг/см ²	J_5/J_0^*	J_{60}/J_0^*	J_1/J_0^{**}
Вихідна ПЕС мембрана	0,26	0,16	0,36
ПЕС + АМПС/140	0,32	0,23	0,40
ПЕС + κДМАЕМ/120	0,40	0,28	0,42
ПЕС+ ГЕМА /140	0,48	0,38	0,70
ПЕС з іммобілізованою протеазою	0,74	0,60	0,78

* J_5/J_0 та J_{60}/J_0 – відносні продуктивності через 5 та 60 хв від початку фільтрування відповідно;

** J_1/J_0 – показник відновлення продуктивності мембран після їх промивки водою.

Показано, що після обробки глютаровим альдегідом мембран з іммобілізованою протеазою їхня продуктивність зростала порівняно із зразками, на яких зшивання ферменту не проводили: 78 та 65 л/м²год. після 20-ти хв фільтрування сироватки відповідно. Ймовірно, в останньому випадку протеолітична активність мембрани зменшується внаслідок переходу частини іммобілізованої протеази з поверхні мембрани в об'єм розчину. При обробці мембрани глютаровим альдегідом процес десорбції ферменту зменшується завдяки утворенню на її поверхні

зшитой гелевої сітки з макромолекул ферменту, що сприяє збереженню каталітичної активності мембрани.

Встановлено, що хімічна природа поверхні мембран істотно впливає на відновлення їхньої продуктивності після промивання водою. Як видно з табл. 3, вихідна гідрофобна ПЕС мембрана і мембрана з негативно зарядженою поверхнею (полі(АМПС)) сильніше забруднюються при УФ молочної сироватки, ніж мембрани з іммобілізованою протеазою або гідрофільною нейтральною поверхнею (полі(ГЕМА)). В останньому випадку позитивну роль, очевидно, відіграє слабка адгезія між високогідрофільним прищепленим полі(ГЕМА) і шаром білкових компонентів, який формується на мембрані у процесі УФ, внаслідок чого модифікована мембрана краще очищується при промиванні водою.

Завдяки каталітичній дії іммобілізованого ферменту білковий шар, який забруднює мембрану з іммобілізованою протеазою, ймовірно, стає рихлішим і фрагментарнішим порівняно з забруднюючими шарами, що формуються на поверхні інших мембранних зразків, і тому легше видаляється з поверхні при промиванні мембрани водою.

Висновки

Таким чином, проведені дослідження показали, що цілеспрямоване хімічне модифікування поверхні мембран дає мінімізувати їхнє забруднення при УФ молочної сироватки та підвищити ефективність відновлення продуктивності після промивання водою. Показано, що електрохімічні та гідрофільно-гідрофобні властивості поверхні мембран істотно впливають на їх забруднення білковими компонентами сироватки. Встановлено, що гідрофільніші мембрани менше схильні до забруднення порівняно з більш гідрофобними, а здатність до відновлення продуктивності при промиванні у мембран з нейтральною гідрофільною поверхнею є вищою, ніж у мембран із зарядженою поверхнею. Доведено, що мембрани з іммобілізованою протеазою характеризуються вищою продуктивністю при УФ молочної сироватки порівняно з модифікованими мембранами, одержаними за допомогою прищепленої полімеризації вінільних мономерів. Це пояснено здатністю іммобілізованого ферменту розщеплювати білкові макромолекули, які акумулюються на поверхні мембрани, що сприяє зменшенню забруднення мембран при фільтруванні.

Література

1. Кочкодан В. М. Властивості біокаталітичних мембран з іммобілізованою протеазою при ультрафільтрації молочної сироватки / В. М. Кочкодан // Наукові записки НАУКМА. Хімічні науки і технології. – 2010. – Т. 105. – С. 37–41.
2. Влияние поверхностного модифицирования полимерных мембран на их склонность к биозагрязнению / В. М. Кочкодан, Н. Hilal, В. В. Гончарук [и др.] // Коллоид журн. – 2006. – Т. 68, № 3. – С. 299–306.
3. Abu Seman M. N. Reduction of nanofiltration membrane fouling by UV-irradiated graft polymerization technique / M. N. Abu Seman, M. Khayet, Z. L. Bin Ali, N. Hilal // J. Membr. Sci. – 2010. – Vol. 355. – P.133–141.
4. Brans G. Membrane fractionation of milk : state of the art and challenges / G. Brans, C. G. P. K. Schroen, R. G. M. van der Sman, R. M. Boom // J. Membr. Sci. – 2004. – Vol. 243. – P. 263–272.
5. Brink L. E. S. Reducing the protein fouling of polysulfone surfaces and polysulfone ultrafiltration membranes : optimization of the type of presorbed layer / L. E. S. Brink, D. J. Romijn // Desalination. – 1990. – Vol. 78. – P. 209–233.
6. Bryjak M. Modification of porous polyacrylonitrile membranes / M. Bryjak, H. Hodge, B. Dach // Angew. Makromol. Chem. – 1998. – Vol. 260. – P. 25–29.
7. Chen V. Cleaning strategies for membrane fouled with protein mixtures / V. Chen, H. Li, D. Li, et al. // Desalination. – 2006. – Vol. 200. – P. 198–200.
8. Daufin G. Recent and emerging applications of membrane processes in the food and dairy industry / G. Daufin, J. P. EsCudier, H. Carrere et al. // Review Trans IchemE. – 2001. – Vol. 79. Part C. – P. 89–101.
9. He X. C. Reducing protein fouling of a polypropylene microporous membrane by CO₂ plasma surface modification / X. C. He, H. Y. Yu, Z. Q. Tang et al. // Desalination. – 2009. – Vol. 244. – P. 80–89.
10. Huisman I. H. The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration / I. H. Huisman, P. Pradanos, A. Hernandez // J. Membr. Sci. – 2000. – Vol. 179. – P. 79–90.
11. Enevoldsen A. D. Electro-ultrafiltration of industrial enzyme solutions / A. D. Enevoldsen, E. B. Hansen, G. Jonsson // J. Membr. Sci. – 2007. – Vol. 299. – P. 28–37.
12. James B. J. Membrane fouling during filtration of milk – a microstructural study / B. J. James, Y. Jing, X. D. Chen // J. Food Eng. – 2003. – Vol. 60. – P. 431–437.
13. Kim K. J. The performance of ultrafiltration membranes pretreated by polymers / K. J. Kim, A. G. Fane, C. J. D. Fell // Desalination. – 1988. – Vol. 70. – P.229–249.
14. Pieracci J. Photochemical modification of 10kDa polyethersulfone ultrafiltration membranes for reducing of biofouling / J. Pieracci, J. V. Crivello, G. Belfort // J. Membr. Sci. – 1999. – Vol. 156. –P. 223–240.
15. Rosa M. J. Membrane surface characterisation by contact angle measurements using the immersed method / M. J. Rosa, M. N. de Pinho // J. Membr. Sci. –1997. – Vol. 131. – P. 167–180.
16. Susanto H. Via surface functionalization by photograft copolymerization to low-fouling polyethersulfone-based ultrafiltration membranes / H. Susanto, M. Balakrishnan, M. Ulbricht // J. Membr. Sci. – 2007. – Vol. 288. – P. 157–167.
17. Zydney A. L. Protein separation using membrane filtration : new opportunities for whey fractionation / A. L. Zydney // Int. Dairy J. – 1998. – Vol. 8. – P. 243–250.

V. Kochkodan

THE EFFECT OF CHEMICAL NATURE OF POLYMERIC MEMBRANES ON THEIR FOULING WITH WHEY PROTEINS

Polyethersulphone P010 and cellulose C010 membranes modified by means of photochemical grafting of monomers of various chemical nature: 2-acrylamido-methyl-propane sulfonic acid, 2-hydroxyethyl methacrylate and quaternized 2-(dimethylamino) ethyl metacrylate as well as by protease immobilization were used to evaluate their liability to fouling with whey proteins. It was shown that electrochemical and hydrophilic-hydrophobic properties of membranes' surface significantly affect their fouling with whey proteins. The membranes with immobilized protease have possessed the highest fluxes due to the ability of immobilized enzyme to decompose protein macromolecules accumulated and fouled the membrane surface.

Keywords: ultrafiltration, whey, membrane fouling, protease.

Матеріал надійшов 02.04.2012