

ВЛАСТИВОСТІ БІОКАТАЛІТИЧНИХ МЕМБРАН З ІММОБІЛІЗОВАНОЮ ПРОТЕАЗОЮ ПРИ УЛЬТРАФІЛЬТРАЦІЇ МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ

За допомогою адсорбції або фільтрування розчину протеази крізь ультрафільтраційні C010 та P010 мембрани одержано біокаталітичні мембрани з іммобілізованим ферментом. Показано, що такі мембрани характеризуються значно вищою продуктивністю при ультрафільтрації молочної сироватки порівняно з вихідними мембранами завдяки здатності іммобілізованого ферменту розщеплювати білкові молекули, які акумулюються на поверхні мембрани і спричиняють її забруднення. Досліджено вплив кількості іммобілізованого ферменту, його зшивання глютаровим діальдегідом, температури сироватки на роботу біокаталітичних мембран.

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

Вступ

Сьогодні в розвинутих країнах ультрафільтрація (УФ) широко застосовується для обробки молочної сироватки з метою запобігання її скиданню у стічні води та для одержання білкових концентратів, що використовують як харчові добавки [2, 96–98]. Головною проблемою, що ускладнює ультрафільтраційну обробку сироватки, є значне зменшення продуктивності мембран через їх забруднення компонентами молочної сироватки, і в першу чергу, сироватковими білками [6, 432–433]. Для відновлення продуктивності мембран, як правило, їх промивають відповідними мийними розчинами. Проте такі розчини є досить агресивними і їх застосування призводить з часом не тільки до пошкодження мембран та потреби їх заміни, а й створює додаткові екологічні проблеми у зв'язку з необхідністю знешкодження відпрацьованих розчинів [9, 333]. Таким чином, пошук нових підходів до зменшення забруднення мембран у процесі обробки молочної сироватки залишається важливим і актуальним завданням. У зв'язку з цим метою нашого дослідження стала розробка методів одержання та вивчення властивостей полімерних мембран з іммобілізованими ферментами, що завдяки своїм біокаталітичним властивостям проявляли б більшу резистентність до забруднення при ультрафільтрації білкових розчинів, зокрема і молочної сироватки. Такий підхід до зменшення забруднення мембран білками на сьогодні залишається практично не вивченим. Як фермент для іммобілізації на поверхні мембран використано протеазу, яка характеризується

високою протеолітичною активністю до білків молочної сироватки [1, 199].

Матеріали і методи

Протеаза (Е.С. 3.4.24.39) з протеазною активністю 20 000 од/мг, глютаровий діальдегід, фосфатний буфер (рН 7,0) одержані від *Sigma-Aldrich*.

Іммобілізацію протеази проводили на ультрафільтраційних мембранах із регенованої целюлози C010 або поліетерсульфону P010 від *Microdyn-Nadir* (Німеччина). Обидві мембрани за своєю структурою належать до композиційних асиметричних мембран, які складаються з тонкого активного шару, нанесеного на широкопористу підтримуючу полімерну основу. Межа молекулярно-масової затримки в обох мембран за даними виробника становить 10 кДа.

Для проведення адсорбційної іммобілізації протеази зразок мембрани фіксували в спеціальній поліметилметакрилатній рамці таким чином, щоб мембрана контактувала з розчином ферменту тільки зі сторони активного шару. Потім мембрани вносили в чашки Петрі з розчином протеази концентрацією 2–20 мг/см³ у фосфатному буфері (рН 7,0) і витримували протягом 1–10 год при безперервному струшуванні при 20 °С. Після цього мембрани промивали фосфатним буфером та дистильованою водою. Адсорбовану на поверхні частини мембранних зразків протеазу зшивали за допомогою глютарового діальдегіду. Для цього мембрани витримували в 1–4 % водному розчині діальдегіду протягом 2–4 год та промивали фосфатним буфером і дис-

тильованою водою, щоб вилучити з поверхні мембрани залишки зшивного агенту та неімобілізованого ферменту.

При іншому способі іммобілізації розчин протеази фільтрували крізь мембрану в експериментальній комірці тупикового типу ФМ-200 (Мукачєво, Україна) при тиску 200 кПа (без перемішування).

Величини іммобілізованої на мембранах протеази визначали за допомогою *QuantiPro™* аналітичного набору (*Sigma-Aldrich*) за різницею між концентрацією ферменту в розчині до і після адсорбції чи фільтрування, враховуючи також вміст ферменту у промивних розчинах.

pH розчинів ферменту змінювали за допомогою 1 н NaOH та HCl. Величину pH визначали на іонометрі I-160 М.

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 %, pH 4,8–5,0.

При УФ молочна сироватка з ємності об'ємом 5 дм³ при робочому тиску 100 кПа подавалась у мембранну комірку ФМ-200. Час фільтрування становив 1–60 хв, а ступінь концентрування сироватки – 1,2–1,5. Швидкість перемішування розчину в мембранній комірці дорівнювала 280 об/хв. Для підтримання постійної температури сироватку термостували в термостаті BWT-U.

Продуктивність мембран при УФ сироватки визначали за формулою:

$$J = V / S,$$

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

Експериментальна частина

Найпростіший спосіб одержання мембран з іммобілізованими ферментами полягає в адсорбції білків на поверхні мембранних зразків, що відбувається завдяки дії вандерваальсових, гідрофобних та електростатичних взаємодій [8, 134]. Було встановлено, що для досягнення адсорбційної рівноваги протеази на поверхні взятих мембран необхідно 8 год. Як видно із рис. 1, ізотерми адсорбції ферменту на поверхні мембран мають типовий ленгмюрівський характер. Кількість адсорбованого ферменту збільшується з підвищенням концентрації ферменту в розчині, досягаючи плато при адсорбційному насиченні поверхні мембран. При цьому величина адсорбції протеази на мембрані P010 більша, ніж на C010, що пояснюється вищою схильністю білків до адсорбції на більш гідрофобних мембранах [3, 86–88].

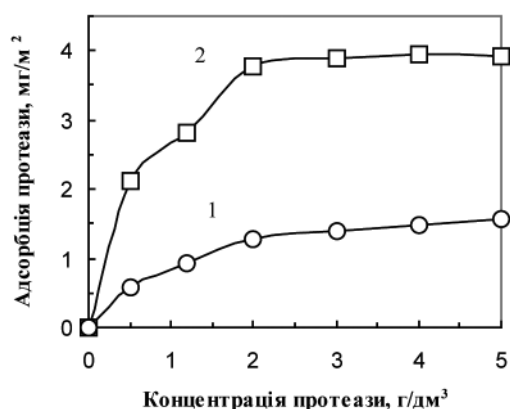


Рис. 1. Ізотерми адсорбції протеази на мембранах C010 (1) та P010 (2): $C_{\text{протеази}} = 1$ г/дм³, pH = 7; $t = 20$ °C, час адсорбції 8 год

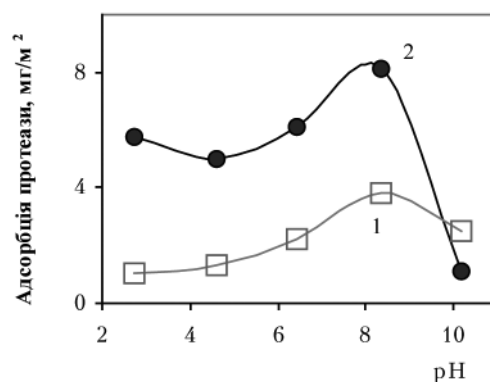


Рис. 2. Залежність величини адсорбції протеази на мембранах C010 (1) та P010 (2) від pH розчину: $C_{\text{протеази}} = 1$ г/дм³, $t = 20$ °C, час адсорбції 8 год

Як видно із рис. 2, найвищі величини адсорбції протеази на мембранах спостерігаються при значеннях pH розчину, що близькі до ізоелектричної точки (ІЕТ) ферменту, яка становить 8,4 [5, 30]. Як відомо, при ІЕТ розчинність білкових речовин у воді мінімальна, що сприяє їх адсорбції на поверхні мембран [4, 5]. Крім того, при ІЕТ макромолекули білка мають у розчині найкомпактнішу конформацію, внаслідок чого на поверхні мембрани формується найщільніший адсорбційний шар. При значеннях pH вище ІЕТ макромолекули білка заряджені негативно й електростатичне відштовхування між ними зменшує кількість адсорбованого ферменту. Те саме відбувається при pH нижчих за ІЕТ, коли молекули білка заряджені позитивно (рис. 2).

Додатковим фактором, що впливає на величину адсорбції протеази на поверхні мембрани, є електростатичні взаємодії між макромолекулами ферменту та поверхнею мембрани. Відомо, що поліетерсульфонова та целюозна мембрани характеризуються негативним зарядом поверхні, абсолютна величина якого зростає із збільшенням pH розчину [11, 138–139]. Отже, при висо-

ких рН розчину внаслідок електрохімічного відштовхування між однойменно зарядженими макромолекулами протеази та мембранами адсорбція на їх поверхні буде зменшуватись, і навпаки при рН, які нижчі за ІЕТ, електрохімічне притягання позитивно заряджених макромолекул ферменту до негативно зарядженої поверхні мембран сприяє збільшенню величини адсорбції протеази (рис. 2).

Раніше було показано, що за умови адсорбційного насичення глобулярні білки формують на поверхні більш або менш щільно упакований адсорбційний моношар, ємність якого, зокрема для бичачого сироваткового альбуміну становить 6–8 мг/м² [7, 260]. Це досить добре корелює з одержаними нами даними (рис. 1, 2).

Порівняння характеристик вихідної ПЕС мембрани та мембрани з адсорбційно-іммобілізованою протеазою при УФ молочної сироватки показало (рис. 3), що продуктивність вихідної мембрани різко падає від 95 – на початку до 18 дм³/м²год у кінці ультрафільтраційного циклу, тоді як продуктивності для мембрани з іммобілізованим ферментом за аналогічних умов зменшувалась значно повільніше: від 80 до 50 дм³/м²год. Таким чином, мембрана з іммобілізованою протеазою характеризувалась в середньому в 3 рази вищою продуктивністю при УФ молочної сироватки, ніж вихідна ПЕС мембрана. Така істотна різниця, очевидно, пояснюється здатністю іммобілізованого ферменту розщеплювати білкові молекули, які акумулюються на поверхні мембрани і спричиняють її забруднення. Отже, мембрана з іммобілізованим ферментом проявляє здатність до самоочищення в процесі фільтрування молочної сироватки, що призводить до значно вищої продуктивності цієї мембрани порівняно з вихідною не модифікованою мембраною.

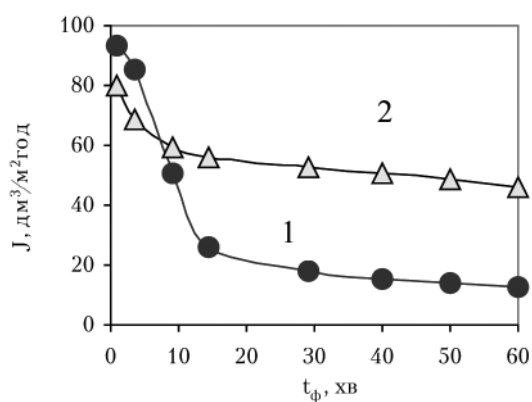


Рис. 3. Залежність продуктивності ультрафільтрації від часу фільтрування молочної сироватки крізь вихідну P010 мембрану (1) та мембрану з адсорбційно іммобілізованою (3,8 мг/м²) протеазою (2): Робочий тиск 100 кПа; рН = 4,8

Для збільшення кількості іммобілізованого на поверхні мембрани ферменту розчин протеази фільтрували крізь мембрану. Оскільки межа молекулярно-масової затримки мембрани (10 кДа) нижча, ніж молекулярна маса протеази 27 кДа [5, 30], то фермент практично повністю затримується на поверхні мембрани. Величину завантаження ферменту на мембранах змінювали при фільтруванні крізь мембрану різних об'ємів розчину протеази. Так було одержано мембрани із 0,02–0,6 г/м² іммобілізованої протеази, що значно більше, порівняно зі зразками, одержаними при адсорбційній іммобілізації ферменту.

Було встановлено, що мембрана з протеазою, іммобілізованою на її поверхні при фільтруванні, менш схильна до забруднення, ніж мембрана з адсорбційно-іммобілізованою протеазою (рис. 4). Це пояснюється більшою кількістю ферменту на першій мембрані, в результаті чого гідроліз забруднювальних білкових компонентів на ній відбувається ефективніше. Разом з тим збільшення кількості протеази на поверхні мембрани від 120 до 400 мкг/см² призводить лише до незначного покращення продуктивності мембран з часом фільтрування (рис. 4, криві 2–4). Отже, за умови формування на поверхні мембрани шару ферменту певної товщини тільки та частина ферменту, яка розміщена на зовнішній стороні й контактує з сироваткою, задіяна у реакції каталітичного гідролізу молочних білків, що надходять із розчину до поверхні мембрани. Доступ субстратів до каталітично активних центрів протеази в глибині іммобілізованого на мембрані шару ферменту, очевидно, є ускладненим. Таким чином, надмірна кількість іммобілізованого ферменту на поверхні мембран є неефективною і не призводить до суттєвого підвищення продуктивності біокаталітичної мембрани.

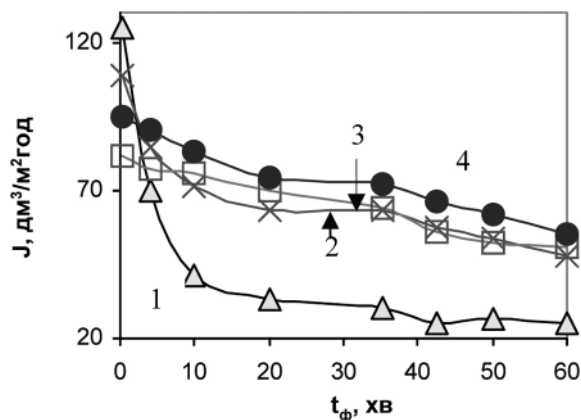


Рис. 4. Залежність продуктивності від часу УФ молочної сироватки крізь P010 мембрану з адсорбційно іммобілізованою протеазою (1) та крізь мембрану з протеазою, іммобілізованою при фільтруванні, при різних завантаженнях (мкг/см²): 120 (2); 250 (3); 400 (4); рН = 4,8; робочий тиск 100 кПа; t = 20 °C

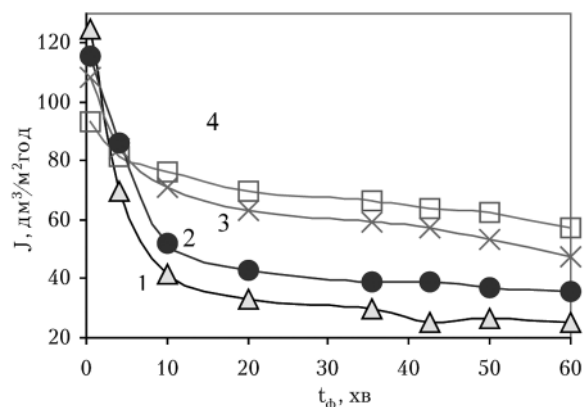


Рис. 5. Залежність продуктивності від часу УФ молочної сироватки крізь P010 мембрани з адсорбційно іммобілізованою протеазою (1, 2) та протеазою, іммобілізованою при фільтруванні при завантаженні 120 мкг/см² (3, 4). Зразки мембран (2, 4) зшиті глютаровим діальдегідом; рН = 4,8; робочий тиск 100 кПа; t = 20 °С.

Важливо зазначити, що після зшивання іммобілізованої протеази глютаровим діальдегідом мембрани характеризувались вищою продуктивністю, ніж ті зразки, на яких зшивання не проводилось (рис. 5). Це очевидно, пояснюється можливістю переходу частини протеази з поверхні мембрани у розчин, що призводить до зменшення протеолітичної активності мембрани. Процес десорбції ферменту мінімізується при зшиванні протеази глютаровим альдегідом, коли на поверхні мембрани утворюється своєрідна зшита гелева сітка із макромолекул білка.

Було встановлено, що температура молочної сироватки суттєво впливає на роботу мембран з іммобілізованим ферментом. Як видно із рис. 6, 7, продуктивність УФ як вихідної мембрани, так і мембрани з іммобілізованим ферментом зростає з підвищенням температури, проте в останньої це зростання значно помітніше. Відомо, що продуктивність УФ підвищується зі збільшенням температури внаслідок зменшення в'язкості розчину [10, 168]. Для мембран з протеолітичною активністю додатковим чинником, який впливає на збільшення продуктивності за цих умов, може бути зростання каталітичної активності ферменту та його здатності розщеплювати білкові макромолекули, що забруднюють мембрану. Найвище зростання продуктивності на мембранах з іммобілізованою протеазою спостерігалось при температурі молочної сироватки 50 °С. Очевидно, за цієї температури каталітична активність протеази є найвищою, тоді як при подальшому підвищенні температури активність ферменту зменшується.

При вивченні можливості повторного використання біокаталітичних мембран у процесі УФ молочної сироватки було встановлено, що зі збільшенням числа ультрафільтраційних циклів

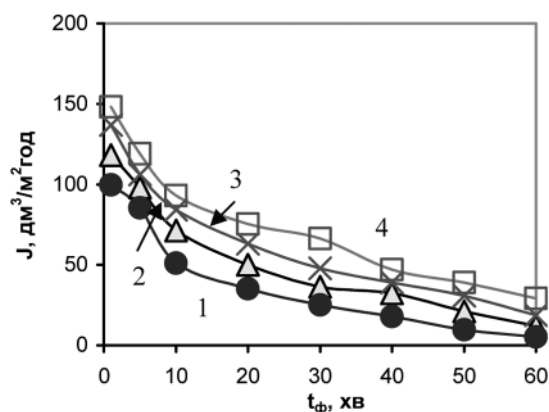


Рис. 6. Залежність продуктивності від часу УФ молочної сироватки крізь мембрану P010 при різних температурах, °С: 20 (1); 40 (2); 50 (3); 60 (4); рН = 4,8; робочий тиск 100 кПа

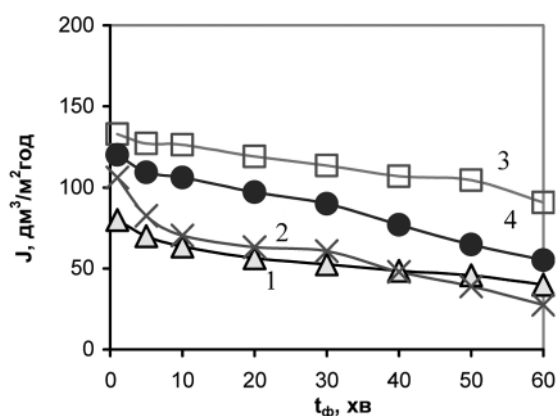


Рис. 7. Залежність продуктивності від часу УФ молочної сироватки крізь мембрану P010 з іммобілізованою протеазою (120 мкг/см²) при різних температурах, °С: 20 (1); 40 (2); 50 (3); 60 (4); рН = 4,8; робочий тиск 100 кПа

Таблиця 1. Залежність продуктивностей вихідної ПЕС мембрани та мембрани з іммобілізованою протеазою при УФ молочної сироватки від кількості фільтраційних циклів. Тривалість фільтроциклу 1 год¹

Кількість фільтраційних циклів	Середня продуктивність за цикл УФ, дм ³ /м ² ·год	
	Вихідна P010 мембрана	P010 мембрана з іммобілізованою протеазою
1	32	52
2	18	49
3	15	47
4	13	46

не відбувалось значного падіння продуктивності мембрани з іммобілізованою протеазою, на відміну від вихідної мембрани, продуктивність якої суттєво зменшувалась (табл. 1). При цьому середня продуктивність для біокаталітичної мемб-

¹ Після фільтрувального циклу мембрани промивали дистильованою водою та залишали у ній на ніч.

рани протягом відповідного циклу УФ була значно вищою, ніж вихідної ПЕС мембрани. Ці результати свідчать про збереження протеолітичної активності мембрани з іммобілізованою протеазою з часом та можливість їх повторного використання.

Висновки

У результаті проведених досліджень показано, що мембрани з іммобілізованою протеазою менше забруднюються при УФ молочної сироватки, ніж вихідна мембрана завдяки здатності

іммобілізованого ферменту розщеплювати білкові молекули, які акумулюються на поверхні мембрани і спричиняють її забруднення. Встановлено, що при формуванні на поверхні мембрани шару ферменту певної товщини тільки та частина ферменту, яка контактує з сироваткою, задіяна у реакції каталітичного гідролізу молочних білків. Показано, що зшивання іммобілізованої на мембрані протеази глутаровим альдегідом та нагрівання сироватки до 50 °С підвищує резистентність біокаталітичних мембран до забруднення їхньої поверхні білковими компонентами молочної сироватки.

- [1] Cleaning strategies for membrane fouled with protein mixtures / V. Chen, H. Li, D. Li, et al. // *Desalination*. – 2006. – Vol. 200. – P. 198–200.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Ehsani N. Fractionation of BSA and myoglobin with modified and unmodified ultrafiltration membranes / N. Ehsani, M. Nyström // *Bioseparation*. – 1995. – Vol. 5. – P. 1–10.
- [5] Enevoldsen A.D. Electro-ultrafiltration of industrial enzyme solutions / A. D. Enevoldsen, E. B. Hansen, G. Jonsson // *J. Membrane Sci.* – 2007. – 299. – P. 28–37.
- [6] 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.
- [7] Norde W. The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces. I. Adsorption isotherms. Effects of charge, ionic strength and temperature / W. Norde, J. Lyklema // *J. Coll. Int. Sci.* – 1978. – Vol. 66. – P. 257–268.
- [8] Parfitt G. D. Adsorption from solution at the solid/liquid interface / G. D. Parfitt, C. H. Rochester. – London–New York : Academic Press, 1983. – 256 p.
- [9] Tragard G. Membrane cleaning / G. Tragard // *Desalination*. – 1989. – Vol. 71. – P. 325–335.
- [10] Singh R. Hybrid Membrane Systems for Water Purification : Technology, System Design and Operations / R. Singh. – Elsevier Science & Technology Books. – 2006. – 291 p.
- [11] Susanto H. Influence of ultrafiltration membranes characteristics on adsorptive fouling with dextrans / H. Susanto, M. Ulbricht // *J. Membr. Sci.* – 2005. – Vol. 266. – P. 132–142.

V. Kochkodan

PROPERTIES OF BIOCATALYTIC MEMBRANES WITH IMMOBILIZED PROTEASE AT WHEY ULTRAFILTRATION

Using adsorption or filtration of protease solution through ultrafiltration C010 or P010 membranes the biocatalytic membranes with immobilized ferment were obtained. It was shown that fluxes for biocatalytic membranes during whey ultrafiltration were essentially higher comparing with the initial membrane. This is due to proteolytic activity of immobilized ferment and its ability to decompose the protein molecules accumulated and fouled the membrane surface. The effects of ferment loading, crosslinking with glutare aldehyde, whey temperature on performance of biocatalytic membranes were studied.

Keywords: biocatalytic membrane, protease, ultrafiltration, whey, membrane fouling.