キトサン限外濾過膜 II. タンパク質排除に与える膜電荷効果

桜井謙資・上田賢司・高橋利禎

福井大学工学部 ☎ 910 福井市文京 3-9-1

Chitosan Membrane for Ultrafiltration

II. Effect of Membrane Charge on Rejection of Proteins.

Kensuke Sakurai, Kenji Ueda and Toshisada Takahashi

Faculty of Engineering, Fukui University, Bunkyo 3-9-1, Fukui 910, Japan

Chitosan membranes for ultrafiltration were prepared by casting acetic acid solutions of chitosan including polyethylene glycol (PEG) as an additive. The additive was eliminated by elution in hot water after the neutralization of membrane. The ultrafiltration through the chitosan membrane was carried out using the solutions of proteins such as bovine serum albumin and γ -globulin. It was found that the rejection of proteins depended on the pH of the solution and it changed drastically in the vicinity of the pH of the isoelectric point of the protein (pH_I). The high rejection was observed at the pH lower than the pH_I and the rejection was no longer observed beyond the pH_I . These facts mean the interaction between the membrane charge and the protein.

The permeation rate of the solution was kept constant in the pH region more than pH 6 but it largely decreased in the lower pH region. It was considered from the SEM observations that the chitosan membrane was partially desolved in the low pH buffer solution and at the same time some micropores which had existed on the air-side surface disappeared and became the dense layer.

In addition, it was recognized that an appropriate membrane structure was required for the charged ultrafiltration membrane.

Key words : chitosan, ultrafiltration, membrane charge, rejection, albumin, γ -globulin, membrane structure

1. 緒 言

一般に中・高分子の分離, 除去や分子分画を目的とする限外濾過は, 微多孔膜の微細孔による「ふるい効果」に依存している. 一方, 水中で電離する高分子電解質やタンパク質の限外濾過では, 膜自体が電荷を持つと荷電効果も加わり, 分離特性の向上や排除率の pH 制御も期

待できる. 近年, このような膜を荷電型限外濾過膜^{1, 2)}と呼び注目されてきた. われわれは最近キトサン限外濾過膜の一連の研究^{3, 4)}を行い, 製膜法と膜構造の関係およびこの膜の持つ有効固定電荷密度等について検討してきた. 本研究では, キトサン限外濾過膜によるタンパク質の限外濾過特性, 特に, 膜電荷効果について検討した.

Fig. 1 Rejection of proteins as a function of pH of the solution.
(○) γ -globulin, (●) albumin.

2. 実験

2.1 試料および製膜法

前報³⁾と同じ製膜法にしたがい、M50-50膜（製膜時の添加剤に分子量 50,000 のポリエチレングリコールを 50 部添加して作製した膜）を準備した。この膜を 0.05 % グルタルアルデヒド水溶液に 30 分間浸漬し、架橋処理した膜を実験に使用した。膜厚は約 70 μm であった。

2.2 限外濾過測定

アルバックサービス社製限外濾過装置モデル MC-2（有効膜面積 12.5 cm^2 ）を用い、操作圧力 1 kg/cm^2 、温度 25°C で測定し、タンパク質溶液の透過速度とタンパク質の排除率を求めた。タンパク質溶液は膜面上約 3 mm の位置にある攪拌子により常に攪拌された。

2.2.1 タンパク質溶液

タンパク質試料は、シグマ社製、牛血清アルブミン（等電点 4.7~5.0, 平均分子量 69,000）と γ -グロブリン（等電点 6.5~7.0, 平均分子量 156,000）を用いた。これらを緩衝液に溶かし、0.2 wt% 溶液を準備して透過原液とした。緩衝液には、酢酸緩衝液 (0.1 M)、リン酸緩衝液 (0.1 M)、トリス-塩酸緩衝液 (0.05 M) を用いた。

2.2.2 タンパク質排除率

排除率 Re (%) は次式で与えられる。

$$\text{Re} = \{1 - (C_p/C_f)\} \times 100$$

ここで、 C_f と C_p はタンパク質溶液の供給側および透

Fig. 2 Permeation rate of the protein solution as a function of pH of the solution.
(○) γ -globulin, (●) albumin.

過側の濃度であり、島津製作所(株)分光光度計 UV-160 により 280 nm の吸光度測定から求めた。

2.3 走査型電子顕微鏡観察

凍結乾燥した試料膜の表面を金蒸着した後、日立製作所モデル S-510 を用いて SEM 観察を行った。

3. 結果および考察

タンパク質溶液の透過実験より得たアルブミンと γ -グロブリンの排除率を図 1 に示す。膜電荷効果（ドナン排除効果）を詳しく検討するには、タンパク質溶液の濃度依存性を検討する必要があるが、ここでは 0.2 wt% 溶液の場合の pH 依存性を検討した。図 1 に見られるように、両タンパク質ともに等電点を境に排除率が大きく変化している。タンパク質の pH による荷電効果の検討は、厳密には緩衝液のイオン強度一定の下で行う必要があるが、ここで使用した緩衝液のイオン強度は、タンパク質の濃度（アルブミン： 2.9×10^{-5} M, γ -グロブリン

Fig. 3 SEM photographs of M50-50 crosslinked by glutaraldehyde.
(a), (b) air-side and dish-side surfaces conditioned in pH 4.2 buffer solution,
(c), (d) those conditioned in pH 7.2.

ン: 1.3×10^{-5} M) に比べて十分大きいと考えて調整しなかった。等電点より低い pH 領域で排除率は高く、高い pH 領域で低くなる。キトサン限界濾過膜は前報⁴⁾で示したように、水中で分子内のアミノ基のプロトン化による固定電荷を生じカチオン膜となるが、その有効固定電荷密度は溶液 pH の低下とともに増大すると考えられる。一方、タンパク質は等電点より低い pH で正に帯電し、高い pH で負に帯電する。排除率の pH 依存は、このようなキトサン膜とタンパク質の静電相互作用によることが明らかである。また、等電点より高い pH 領域で排除率がほぼ 0% を示したことは、負に帯電したタンパク質とカチオン膜の静電相互作用に加えて、この膜の微細孔による「ふるい効果」ではタンパク質透過を阻止で

きないことを意味している。換言すると、このキトサン限外濾過膜はタンパク質透過に対して十分大きな微細孔を持つが、低い pH 領域では膜電荷効果によりタンパク質透過を阻止していると考えられる。

図 2 にタンパク質溶液の透過速度の pH 依存性を示した。透過速度は pH 6.4 以上ではほぼ一定値を示し、pH に依存しなかった。また、緩衝液のみの透過速度と比較して、わずかに低下し、濃度分極効果が生じた。その程度は分子量の高い γ -グロブリンの方が大きかった。一方、pH 6 以下では透過速度は 1 桁以上低下し、膜構造の大きな変化を示唆した。このとき、透過速度は緩衝液のみの場合にほぼ等しく、濃度分極効果は認められなかった。

緩衝液中での膜構造の変化を調べるために、pH 4.2 および pH 7.2 の緩衝液中に十分浸漬した膜の表面観察を行った。図 3 に SEM 観察結果を示す。組織の粗い空気側表面の (a), (c) を比較すると、構造変化は明らかである。pH 7.2 では膜の表面構造は変化しないが、pH 4.2 ではキトサン膜の部分溶解によると思われる溶着状態が見られ、シャーレ側表面の (b) についてもポアサイズに変化は見られないが、鱗状の凹凸が生じた。したがって、低い pH 領域での透過速度の減少は、主に空気側表面の構造変化、すなわち、表面に占める微細孔分率の低下によると思われる。

他方、排除率は透過速度の低下に伴い、一般に増大することが認められている。これは「ふるい効果」によるものである。したがって、図 1 の低 pH における高い排除率に関してこの効果も考えられるが、 γ -グロブリンの場合に見られるように、pH 7 付近でも高い排除率を示し、このことが膜電荷効果を明示している。

最後に、M50-50 と製膜条件の異なるキトサン微多孔膜についても限外濾過特性を検討したが、その場合、膜電荷効果をはっきりと認めることができなかった。すなわち、多孔度の小さな膜では、溶液透過速度は低下し、排除率は pH 依存性を示さず高い値を示した。逆に多孔度の高い膜では、透過速度は上昇し、排除率は小さく、pH 依存性も低かった。このように、荷電型限外濾過膜として膜電荷効果を期待するには、適当な膜構造が必要

になることが認められた。

4. 結 論

PEG を添加して作製したキトサン限外濾過膜について、牛血清アルブミンと γ -グロブリンの限外濾過特性を検討して、次の結果を得た。

排除率は、pH 依存性を示し、各タンパク質の等電点を境に大きく変化した。等電点より低い pH 領域で高い排除率を与え、膜電荷効果を明示した。

タンパク質溶液の透過速度は、pH 6 以上の領域では一定であったが、低い pH 領域で大きく低下した。

SEM 観察より、低 pH 領域ではキトサン限外濾過膜が部分的に溶解し、膜表面の一部の微細孔部分が消失し、緻密化すると思われた。

荷電型限外濾過膜として膜電荷効果を期待するには、適当な膜構造が必要であることが認められた。

参考文献

- 1) H. Miyama, K. Tanaka, Y. Nosaka, N. Fujii, H. Tanzawa and S. Nagaoka, *J. Appl. Polym. Sci.*, **36**, 925 (1988).
- 2) H. Miyama, H. Manago, Y. Nosaka, N. Fujii and H. Tanzawa, *膜*, **14**, 45 (1989).
- 3) 桜井謙資, 上田賢司, 高橋利禎, *膜*, **16**, 347 (1991).
- 4) 桜井謙資, 中嶋一博, 高橋利禎, *膜*, (投稿中, 第 3 報).

(受付 1991 年 4 月 1 日)