[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.62, No.7, pp.1061~1066, 1988]

すり身廃水タンパク質による自己阻止型

ダイナミック膜の電子顕微鏡観察†

渡辺敦夫, 昌子 有*, 中嶋光敏, 鍋谷浩志, 大谷敏郎
(農林水産省食品総合研究所, *大洋漁業株式会社)

昭和 62 年 12 月 7 日 受 理

Electronmicroscopic Observation of Self-Rejection-Type Dynamic Membrane Formed with Water Soluble Proteins in Waste Water from Fish Paste Process

Atsuo WATANABE, Tamotsu SHOJI*, Mitsutoshi NAKAJIMA, Hiroshi NABETANI
and Toshio OHTANI

National Food Research Institute, Ministry of Agriculture,
Forestry and Fisheries, Tsukuba 305

*Taiyo Central R & D Institute, Taiyo Fisheries Co., Tsukishima 3, Chuo-ku, Tokyo 104

The preceding report showed that the pore diameter of ceramic support affected the self-rejection characteristics of the above dynamic membrane. To investigate this membrane in more detail, changes in rejection characteristics during membrane formation process were examined and membrane-forming protein was quantified. Microscopic observations on the membrane surface were also carried out using a scanning electron microscope.

A large part of this membrane existed as a fouling layer on the uneven surface of the ceramic support and the remaining part existed as a sticking layer on the fouling layer. The thickness of this membrane was about $5\mu\text{m}$, which was much thinner than that of the ceramic support. This study indicated the possibility of a membrane forming process, but more detailed investigation would be necessary to explain the process completely.

(Received December 7, 1987)

緒 言

前報⁽¹⁾で、すり身廃水からのタンパク質回収に適した自己阻止型ダイナミック膜を製膜する目的で、孔径 $0.2 \sim 0.5\mu\text{m}$ のセラミック支持体を用い、圧力 0.45MPa 、流速 55cm s^{-1} の条件下で製膜を行ったところ、迅速に、分画分子量 $10,000$ 程度の膜が形成できた。さらに、製膜後、流速を増加させ透過運転を続けたところ、阻止率は変化せず、透過流速のみを高めることができた⁽¹⁾。ダイナミック膜の阻止機能は、供試液中のタンパク質が、セラミック支持体表面への付着、あるいは支持体細孔への目詰まりにより発現されると考えられる。そこ

で、このダイナミック膜の性質を調べるため、製膜過程での阻止性能の変化、ダイナミック膜を形成している支持体への付着あるいは目詰まりタンパク質の定量分析、さらに、膜の電子顕微鏡観察等を行い、若干の知見が得られたので報告する。

実 験 方 法

1. 供試液の調製 前報⁽¹⁾と同じ方法で調製した。
2. 装置 前報⁽¹⁾と同じ装置を用いた。
3. 製膜過程での阻止性能の変化 前報⁽¹⁾で用いた 5 種類の孔径 ($0.2, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5\mu\text{m}$) のセラミック支持体を用い、圧力 0.3MPa 、流速 55cm s^{-1} の条件下で製膜したときの、製膜が完了するまでの膜の阻止性能の変化 (製膜される様子) を、前報⁽¹⁾に示した高

† 自己阻止型ダイナミック膜によるすり身廃水からのタンパク質回収についての研究 II

速ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) による各分子量タンパク質のピーク高さより算出した見かけの阻止率 (R_{obs}) により調べた。

4. 製膜前後での純水透過流束の変化および膜形成にあずかるタンパク質の定量 孔径 $0.7\ \mu\text{m}$ の支持体を用い、圧力 $0.3\ \text{MPa}$ 、流速 $55\ \text{cm s}^{-1}$ 、温度 15°C の条件下の製膜前後の純水透過流束を測定した。測定用の純水としては、イオン交換水をさらに限外濾過し微粒子を除いた水 (UF 水) を用いた。

また、製膜後、セラミック支持体の管内壁の付着層を、シリコンゴムブランジャーで押し出し、ケルダール法で付着タンパク質の定量を行った。その後、セラミック支持体とともに硫酸で分解し目詰まりタンパク質の定量を行った。

5. ダイナミック膜形成タンパク質の染色 上記条件下で製膜後の支持体を、染色液 (クマシーブリアントブルー $0.1\ \text{wt}\%$ 、酢酸 $10\ \text{vol}\%$ 、メタノール $50\ \text{vol}\%$ 、水 $40\ \text{vol}\%$) 中に約 30 分攪はん浸漬し支持体付着あ

Fig.1 Changes of Rejection during Dynamic Membrane Formation on Ceramic Tube. Operating conditions are temperature 15°C , mean flow velocity $55\ \text{cm s}^{-1}$ and pressure $0.3\ \text{MPa}$. Solid lines denote the rejection abilities at 0.5 min ($\circ$), 5 ($\square$), 20 ($\triangle$), 60 ($\bullet$), 120 ($\blacksquare$) and 180 ($\blacktriangle$) after membrane formation of pore size $1.5\ \mu\text{m}$ diameter ceramic tube is started. Broken line denotes the rejection ability at 0.5 min ($\diamond$) after membrane formation of pore size $0.2\ \mu\text{m}$ diameter ceramic tube is started.

Photo 1 Photograph of Coomassie Brilliant Blue-stained Ceramic Tubes before and after Dynamic Membrane Formation. Operating conditions of membrane formation are diameter of pore of ceramic tube $0.7\ \mu\text{m}$, temperature 15°C , feed velocity $55\ \text{cm s}^{-1}$ and pressure $0.3\ \text{MPa}$. The photograph of left-hand side is observation of the inner surfaces of ceramic tubes before (lower) and after (upper) dynamic membrane formation. The photograph of right-hand side is observation of the section of ceramic tube after dynamic membrane formation.

Photo 2 Electron Microscope Photograph of the Inner Surfaces of Ceramic Tubes before and after Dynamic Membrane Formation. Operating conditions of membrane formation are the same as Photo 1. The length of the line in the photographs is correspond to $5\mu\text{m}$.

Photo 3 Electron Microscope Photograph of the Sections of Ceramic Tubes before and after Dynamic Membrane Formation. Operating conditions of membrane formation are the same as Photo 1. The length of the line in the photographs is correspond to $5\mu\text{m}$.

るいは目詰まりタンパク質を染色し、水洗、脱色（酢酸 7.5 vol%, メタノール 5 vol%, 水 87.5 vol% 中約 30 分攪はん浸漬）後、支持体管内壁、外壁、断面を観察した。

6. ダイナミック膜の電子顕微鏡観察 上記の条件

下で製膜後、あるいは製膜していない支持体の管内壁表面および断面を、日立 X 560 型走査型電子顕微鏡で観察した。製膜、および製膜していない支持体とも、自然乾燥後破断し、約 $20\text{\AA}$ の厚さに金を蒸着させたものを用いた。また、電子顕微鏡視野中の炭素原子分布を、炭

Photo 4 Carbon Atoms Distributions of the Electron Microscope Photograph of Photo 3. Analysed with C-K α rays.

Photo 5 Electron Microscope Photograph Indicating the Inner Surfaces and Sections of Ceramic Tubes Simultaneously before and after Dynamic Membrane Formation. Operating conditions of membrane formation are the same as Photo 1. The length of the line in the photographs is correspond to 5 μ m.

素 K α 線で日立波長分散型 X 線分析装置 (WDX) を使って調べた。

実 験 結 果

1. 製膜過程での阻止性能の変化

Fig. 1 に、前報⁽⁴⁾でもっとも製膜に時間のかかった孔径 1.5 μ m の支持体の製膜過程の阻止性能の経時変化を

示す。製膜操作開始後 30 秒の GPC クロマトグラムの測定は、操作開始後 15 秒から、45 秒までの間の透過液を用いて行った。製膜操作開始 30 秒後は、どの分子量のタンパク質成分も全く阻止されていないが、その後、中間的な大きさの分子量 (10,000~100,000) 成分が阻止され始め、やがて、大きい分子量成分が阻止され、阻止率 100% となって、膜形成を終了するといった、特徴的

Table I. Changes of Pure Water Flux (PWF) of Ceramic Tube before and after Dynamic Membrane Formation and Removal of Deposit Layer

	PWF $\times 10^4$ (cm ³ cm ⁻² s ⁻¹)
Ceramic tube	1080
after dynamic membrane formation	4.1
after removal of deposit layer	9.0

Operating conditions :

Pore size of ceramic tube 0.7 μ m diameter

Temperature 15°C

Feed velocity, pressure 55 cm s⁻¹, 0.3 MPa

な経過を示している。各分子量成分の阻止率は、実験方法のところで示したように GPC クロマトグラム中の各ピーク高さの比から計算しているが、クロマトグラムのピークのショルダー部を考慮しても、あるいはピーク面積比から計算しても、このような特徴的な経過が認められた。これは、中間分子量のタンパク質成分は、とくに凝集性が強く、製膜操作開始直後から、優先的にセラミック支持体の細孔を塞ぎ、あるいは付着し、膜の形成に関与したため、このような特徴的な経過をたどったと推定される。あるいは、供試液中では多量体、GPC 中では解離するタンパク質成分の存在も考えられる。このメカニズムの解明については、さらに詳細な実験が必要であろう。Fig. 1 は孔径の 1.5 μ m の支持体を用いた例である。この現象は、孔径の小さい 0.2, 0.5, 0.7, 1.0 μ m の支持体を用いた場合にも認められる。Fig. 1 中に、孔径 0.2 μ m の支持体を用い、製膜操作開始 30 秒後の阻止性能を、破線で示す。この中間的な大きさの分子量成分から阻止され始めダイナミック膜が形成されるという傾向は孔径が大きくなるほど明瞭に現われている。これは、おそらく、支持体孔径が小さいほど、さきに述べたタンパク質成分の凝集による支持体細孔の目詰まりの完了に対して、凝集とは関係のない一般的なタンパク質粒子による目詰まりの完了が早くなるからであろうと推察できる。また、孔径の小さい支持体を用いたほうが、製膜完了に要する時間が短くなるという前報⁽¹⁾の結果ともよい一致を示す。しかしながら、詳細については明らかでなく、さらに検討が必要である。

2. 製膜前後での純水透過流束の変化、およびダイナミック膜形成にあずかるタンパク質の定量

Table 1 に、製膜前後の支持体の純水透過流束を示す。また、製膜後、支持体管内壁表面の付着層の除去を目的

として、内壁表面を機械的にゴムブランジャーで擦洗後の純水透過流束も示す。製膜前後で、純水透過流束は約 1/260 に変化している。内壁表面の擦洗を行うと、極微量の粘着物が得られ、純水透過流束は約 2 倍に回復し、薄い付着層の存在を思わせた。しかし、この粘着性の物質は、あまりに微量だったために、ゴムブランジャーの表面から採集することができず、分析は行えなかった。擦洗後、支持体のタンパク質含量を測定したところ、支持体 1 cm² 当り 0.44 mg であった。ゴムブランジャーでの機械的な擦洗では、支持体内壁の凹凸もあって、付着層は完全に除去できないが、純水透過流束の変化、つまり、流束低下を引き起こす抵抗の増加は、支持体細孔への目詰まりタンパク質、あるいは内壁表面への薄い付着層によるものであると考えられる。

3. ダイナミック膜形成タンパク質の染色

Photo 1 に、製膜後の支持体管内壁表面と断面のタンパク質を染色した状態を示す。支持体管内壁表面は一様に染色されており、内壁表面全体にタンパク質が付着していることがわかる。また、断面写真より、タンパク質は、支持体管内壁から内部へほとんど侵入していないことがわかり、今回の実験で形成したダイナミック膜は、薄いタンパク質層から形成されていることが確認できた。このダイナミック膜は、大谷ら⁽²⁾が報告している卵白アルブミンを膜形成剤としているものとはかなり厚さが異なるものであり、供給液の違いで、かなり形状の違いダイナミック膜が形成される可能性のあることを示唆している。

4. ダイナミック膜の電子顕微鏡観察

Photo 2~5 は、製膜前後での支持体の電子顕微鏡写真である。いずれの写真も、左側が製膜前のもの、右側が製膜後のものである。

Photo 2 は、支持体管内壁表面のもので、内壁のセラミック粒子上に被膜が形成されていることがわかる。この被膜は、上記のタンパク質染色の結果から、ダイナミック膜を形成しているタンパク質であると考えられる。

Photo 3 は、支持体断面のものである。写真の左側が管内壁表面である。支持体内部へのタンパク質の侵入あるいは目詰まりは、ほとんど起こっていない。この電子顕微鏡視野で、C-K α 線で炭素分布を調べたのが Photo 4 である。白い点が炭素原子を表す。白い点の密度にむらがあるのは、支持体断面の凹凸のためであると考えられる。製膜前の支持体に比べて、製膜後のものは、全体

的に炭素密度が高いが、これは、透過液中にも炭素が存在するためであり、電顕試料とした製膜支持体の洗浄が十分でなかったためであろう。Photo 4 で、製膜後のものを見ると、左側に帯状に炭素密度が高い部分が存在するが、これは支持体管内壁付近の部分に一致する。したがって、この高炭素密度部分がダイナミック膜形成タンパク質層であると思われる。この層の厚さは、Photo 4 より約 $5\mu\text{m}$ と推定され、支持体の厚さ (1mm) と比較するとかなり薄い層であることがわかり、また、このことは、上記のタンパク質染色の結果と一致する。実験結果 2 によると、製膜後の支持体へのタンパク質付着量は、 0.44mg cm^{-2} であった。この値には、タンパク質のケルダール法による分析法の性質上、タンパク質以外の低分子のペプチドやアミノ酸の量も含まれており、実際のタンパク質付着量を若干過大評価していると思われるが、仮に、 $5\mu\text{m}$ の厚さのダイナミック形成タンパク質層がすべて支持体管内壁上の付着層であるとする、このタンパク質層のタンパク質濃度は、計算上 88% となり、ゲル層あるいは付着層形成には十分高いタンパク質濃度であると思われる。Photo 3 によると、支持体管内壁上の付着層 (Photo 2 での被膜) の厚さは、 $5\mu\text{m}$ もなく (厚さ $1\sim 2\mu\text{m}$ 程度にしか観察されない) 残りの部分は、支持体内部に侵入しているように思われる。したがって、ダイナミック膜を形成するタンパク質層は、約 $5\mu\text{m}$ の厚さであり、支持体管内壁上の被膜層と、内部への侵入層 (支持体管内壁の凹凸部に目詰まりを起こしている) から構成されていると考えられる。

Photo 5 は、支持体管内壁表面と断面を斜め方向から同時に観察したものである。内壁上の薄いダイナミック膜形成タンパク質被膜層がはっきりと示されている。

結 言

スケトウダラ落とし身水抽出液を供試液として、自己阻止型ダイナミック膜を形成する今回の実験では、供試

液中のタンパク質成分の凝集性の違いが原因と推定される特徴的な製膜過程の阻止性能の変化が見られた。このメカニズムの解明については、さらに詳細な研究が必要であると思われる。

製膜されたダイナミック膜は、支持体厚さに比較して非常に薄い、約 $5\mu\text{m}$ の厚さのタンパク質層で、そのほとんどは、支持体管内壁の凹凸部に目詰まりを起こし、また、一部のものは、付着層を形成しているものと考えられる。すなわち、前報⁽¹⁾で、流速を高めても、純水透過流束に比較すれば、それほど透過流束が上昇しなかったのは、目詰まりが透過流束の抵抗となっていることを示すもので、これら目詰まり物質の上部の付着層が流速の上昇により除去され、透過流束が回復したことを示すものであることが証明された。

要 約

スケトウダラ落とし身水抽出液を供試液として製膜した自己阻止型ダイナミック膜の性質を、製膜過程での阻止性能の変化、電子顕微鏡観察などで調べた結果、次のことがわかった。

中間的な分子量 $10,000\sim 100,000$ のものから阻止され始める特徴的な製膜過程。

膜の厚さは $5\mu\text{m}$ で、支持体に比較すると非常に薄い。

膜は、支持体管内壁上の被膜層と、内壁の凹凸部への目詰まりからなっている。

膜の電子顕微鏡写真を供給して下さいました東陶機器(株)前橋信之氏に深謝いたします。

- (1) 昌子 有, 中嶋光敏, 鍋谷浩志, 大谷敏郎, 渡辺教夫: 農化, **62**, 1055 (1988).
- (2) 大谷敏郎, 渡辺教夫, 星野智巻, 木村尚史: 化学工学論文集 **11**, 140 (1985).