限外濾過分離特性に及ぼすタンパク質のゼータ電位の影響

吉田 裕志・清水 悟史*. 福田 和弘**・ 宇都木純子***・白井佐知子****

Effect of Zeta-potential of Proteinaceous Colloidal Particles on Ultrafiltration Characteristics

Hiroshi Yoshida, Satoshi Shimizu*, Kazuhiro Fukuda**, Jyunko Utsugi***, and Sachiko Shirai****

タンパク質のような両性高分子電解質の場合には、pHによって荷電の状態が異なるので分子 の形状も変化する。したがって、タンパクコロイド溶液の限外濾過分離法においては、溶液の pH環境によってタンパク質分子の荷電状態が変化するため、分離膜面上に堆積する濾過ケーク 構造はpH環境によって異なり、濾液の透過性に影響を与えることが考えられる。このような観 点から、溶液のpHを変えた場合の限外濾過流束がタンパク質分子の荷電状態を表す一つの因子 であるゼータ電位の影響を著しく受けることを実験的に明らかにした。

緒

タンパク質コロイド溶液の濃縮分離法として限外濾 過法が広く利用されている。一般に、両性高分子電解 質であるタンパク質分子はpHによって荷電の状態が 異なるので分子の形状が変化すると考えられる。また、 タンパク質粒子が濾過膜面上に濾過ケークを形成する 際、濾過ケーク層の構造は荷電状態による分子間の静 電的引斥力の影響を受けることが推察される。したがっ て、タンパクコロイド溶液の限外濾過法においては、 溶液のpH環境が変化することによって分離膜面上に 堆積する濾過ケーク構造は変化し、濾液の透過性に影 響を与えることが考えられる。

ケーク濾過においては、生成ケーク層の濾過比抵抗 が濾過速度を左右する重要な因子である。そして、タ

* 平成5年度工業化学科卒業生(現豊橋技術科学大学大学院)
** 平成5年度工業化学科卒業生(現日清紡(株))
*** 平成6年度物質工学科卒業生(現カルビー(株))
***平成6年度物質工学科卒業生(現日本圧着端子製造(株))

ンパク質溶液の限外濾過ではタンパク粒子が濾過膜面 上でゲル化するため、ケーク層は極めて大きな濾過比 抵抗を示す¹⁾。この濾過比抵抗は空隙率などのケーク 構造に大きく依存するので、生成ケーク構造を何らか の方法で制御できるということは濾過操作を行う上で 極めて有意なことになる。

限外濾過分離法における濾過特性を溶液環境や溶質 分子の電荷に関係づける研究はごく最近になってわず かに報告されるようになってきたが²⁻⁶¹、確立された 成果として認められるまでには至っていないのが現状 のようである。そこで本研究では、入谷ら^{5.61}と同様 に、溶液中のタンパク質分子の荷電状態を表す一つの 因子として、界面電気化学における動的現象を支配す る界面動電位、すなわちゼータ電位に着目し、限外濾 過特性に及ぼす溶質分子のゼータ電位の影響について、 デッド・エンド型濾過装置を用いて実験的に検討を行っ た。

1. 濾過分離特性と荷電状態の評価

ケーク濾過の場合の基本的濾過特性は、一般にRuth のケーク濾過理論に基づいて、濾過速度を表すRuth プロットと生成ケークの濾過比抵抗を用いて評価され る¹⁾。入谷らは主にこのRuthの濾過理論に立脚して 限外濾過特性に及ぼす溶液環境の影響について論じて いるが^{2,3,5,6)}、限外濾過膜や精密濾過膜、逆浸透膜な どの分離膜の場合の性能評価は通常、単位濾過面積当 たりの体積流量である膜透過流束、および溶質の阻止 率で評価されている¹⁾。したがって、本報では、分離 膜の場合の透過流束および阻止率を用いて限外濾過特 性に及ぼす溶質分子の荷電状態を表すゼータ電位の影 響について考察検討を行った。

限外濾過では濾過の進行とともに溶質は膜面に輸送 されるので膜面での溶質濃度はしだいに増加する。こ の濃度分極現象^{®)}によって、膜面で阻止された溶質 は原液本体中との濃度差を駆動力として反対に液本体 に向かって拡散するようになる。そして、膜面に向かっ て運ばれる溶質の移動量と拡散による移動量および膜 を透過する量が等しくなると動的平衡状態になり、定 常状態となる。この定常状態における単位膜面積、単 位時間当たりの透過液量が膜透過流束 J₄[m²/(m²· s)]である。

一方、膜の阻止率R[-]は、膜面の溶質濃度を C_m、 透過液濃度を C_pとすると

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_m} \tag{1}$$

で表される。しかし、膜面濃度 Cm を実験で求めるこ とは極めて困難なので、次の見掛けの阻止率 R_{os}が膜 の阻止性能を表すものとして一般に用いられている⁸⁾。

$$R_{obs} = 1 - \frac{C_p}{C_b} \tag{2}$$

ここに、C。は濾過原液濃度である。

固-液系の異相界面近傍に形成される電気2重層中 の可動部分にある電荷に起因して、外部電場によって 電気的に生ずる異相間の相対運動が電気泳動や電気浸 透などの界面動電現象であり、これらの運動速度を大 きく左右するのがゼータ(ζ)電位である。ゼータ電 位は電気2重層構造において運動に関与する任意の位 置の電位差であるが、荷電粒子が接近するときの粒子 間距離に影響を与えるものと推定できる。すなわち、 ゼータ電位が大きいほど粒子間の電気的反発作用は大 きく、濾過ケーク層中の粒子間距離、つまり粒子間隙 は大きくなり、空隙率が増大すると推察される。した がって、限外濾過特性とタンパクコロイド粒子の荷電 状態の相関を考察する上で、ゼータ電位は粒子の荷電 状態の評価方法の一つとして妥当であると考えられる。

ゼータ電位は次のHelmholtz-Smoluchowskiの式⁹⁾ を用いて算出される。

 $ζ = (4 \pi \mu / D) \alpha
 (3)
 ここに、ζ はゼータ電位、μ は分散媒の粘度、Dは分
 散媒の誘電率、α は電気移動度であり、α は既知の電
 場強度下でのタンパクコロイド粒子の電気泳動速度の
 実測値から求めることができる。$

2. 実験装置および方法

実験に用いたデッド・エンド型の加圧濾過試験装置 をFig.1に示す。試料であるタンパク質溶液(濃度: 0.8 g/l)①を加圧濾過器②に供給し、ヘリウムガス ③を用いて気体加圧による定圧(圧力:196 kPa)濾 過実験を行い、濾液量の経時変化を電子天秤④で、ま た濾液中のタンパク質濃度の経時変化を分光光度計で それぞれ測定した。

タンパク質のゼータ電位の測定は、レーザー・ドッ プラー法を利用した電気泳動光散乱光度計(大塚電子 (株): ELS-800)を使用して行った。なお、測定試料 溶液のpHは、0.01N-塩酸および0.01N-水酸化ナトリ ウム水溶液を用いて調整した。

タンパク質試料には、分子量67,000の牛血清アルブ ミン(BSA)(Merck社製)を用いた。また、限外濾 過膜⑤には、公称分画分子量50,000のポリサルホン系 限外濾過膜(アドバンテック東洋(株)製)を使用し た。



Fig. 1 Experimental apparatus for dead-end type pressure filtration

3. 結果および考察

3.1 溶液のpH環境変化による膜透過流束と阻止率の 経時変化

Fig.2は、pH=3.62の試料溶液の場合の膜透過流 束Jの経時変化例を示したものである。図の結果は次 のようなことを表している。濾過初期において膜面近 傍に形成される濃度分極層の濾過抵抗は膜に比べて小 さいためにJは大きい値を示す。しかし、間もなく膜 面上で溶質分子が濾過抵抗の極めて大きいゲル化濃度 に達してゲル層の成長が始まるとJの値は急激に減少 するようになる。その後、ゲル層の表面近傍に十分発 達した濃度分極層ができ、その濃度勾配による溶質分 子の拡散速度と反対に膜面へ向かう移動速度が等しく



Fig. 2 Time variation of volume flux J through membrane



Fig. 3 Time variations of volume flux J through membrane with pH of solution as parameter



Fig. 4 Time variations of observed solute rejection R_{dm} of membrane with pH of solution as parameter

なると、ゲル層の成長は止まって」がほぼ一定となる 定常過程となる。

Fig.3には、試料溶液のpHを変えたときの膜透過 流束の経時変化を同様に示した。pHを変化させた場 合もFig.2と同様な結果が得られることがわかる。こ のような実験結果から、定常状態と見做される膜透過 流束J,をFig.2に示すように図上で近似的に求めた。 溶質の見掛けの阻止率 Rox の経時変化について溶液 のpHをパラメータとして示したのがFig.4である。 図より、Rox は濾過初期に膜だけによる分離機構のた めかやや小さい値を示すが、前述したように、時間の 経過とともにゲル層が成長するためにしだいにほぼ一 定の値に近づくことがわかる。また、後に詳述するが、 本図からは定常状態での阻止率はpHの値にはほとん ど依存しないことがわかる。一定となったRoxの値は 約95%程度であり、膜の阻止性能としては十分である といえる。

3.2 膜透過流束およびゼータ電位のpH依存性

実験に使用したタンパク質:牛血清アルブミン (BSA)のゼータ電位くのpH依存性はFig.5のような 実測結果として示される。これより、BSAタンパク質 は酸性側で正、塩基性側で負の電荷を有することがわ かる。また、く電位が0、すなわち正味の電荷が0の 所のpHが等電点(pI)であり、およそpI=4.8となっ た。したがって、本実験試料の場合、pHが約4.8付近 でタンパク粒子間の静電的反発作用は最も小さくなり、 van der Waals力による緻密な濾過ケーク層が形成 される。また、その正負の極性には依らずにくの絶対



Fig. 5 Relation between ζ-potentials of BSA protein and pH of solution

値が大きくなるほど静電反発力が増加するため、より 粗な構造のケーク層が形成されるものと推察される。 このことは、入谷らが独特な濾過実験装置を用いて濾 過ケーク層の平均空隙率や平均濾過比抵抗を測定する ことによって既に実証している^{2.5)}。入谷らは、酸化 チタンのような微粒子の精密濾過の場合は等電点近傍 で粒子の凝集作用によってケーク層の平均空隙率が最 も大きくなって濾過しやすくなるのに対して、タンパ ク質粒子の限外濾過の場合はタンパク質が親水コロイ ドであるために凝集作用が起こらず、まったく反対に 等電点付近で濾過しにくくなるという興味ある実験結 果の報告をしている⁵¹。

Fig.6は定常状態における膜透過流束J,のpH依存 性について示したものである。Fig.5の結果で得られ たpI=4.8の等電点付近で生成ケーク層は最も緻密に なる、すなわち最小の空隙率になるために濾過しにく く、J,は最小の値をとるものと推定できる。しかし、 pHが強酸性側および塩基性側でJ,は大きな値を示し ており、前述のように、く電位の極性には関係なくそ の絶対値の大きさにJ,の値は依存すると理解できる。 このような結果はゼラチンコロイド溶液の場合にも得 られている¹¹。

Fig.7はFig.4で示された定常状態における阻止率 Resc のpH依存性を詳細に示したものである。Fig.4 において Resc はpHの変化にほとんど影響を受けない ように見られたが、Fig.7の結果からは、考慮するま での必要がないかもしれないものの、厳密にはpHの 増加とともにやや減少する傾向があることがわかる。 この理由については明確になっていないが、タンパク 質分子の形状が荷電の状態だけでなく、強酸性や強塩



Fig. 6 Relation between terminal values J, of volume flux through membrane and pH of solution





基性におけるイオン強度に影響されることが考えられ る。また、分離膜のゼータ電位とタンパク質粒子の電 気的相互作用の影響も考慮しなければならない一因に なっているかもしれない。

3.3 膜透過流束とゼータ電位の相関

Figs.5および6の結果に基づいて、定常流束J・と く電位の関係を示したのがFig.8である。図中の曲線 は実測値のプロットに基づいてフィッティング法で求 めたJ・とくの関係である。曲線はく電位が0の所を 軸にしたほとんど対称の放物線で表され、実測値は放 物線に対してほぼ良好な一致を示していることがわか る。これより、く電位の絶対値をとり、J・と|く|の 関係を示したのがFig.9である。図中の○のプロット はく電位が負のとき、●のプロットはく電位が正のと きの測定値である。図から、く電位の正負の極性には



Fig. 8 Correlation between terminal values J_1 of volume flux through membrane and ζ - potentials of BSA protein



Fig. 9 Correlation between terminal values J_τ of volume flux through membrane and absolute values of ζ-potentials | ζ | of BSA protein

ほとんど関係なく、ζ電位の絶対値 | ζ | の値が大き くなるとJ,は増大することがわかる。このことは、 前述したように、ζ電位が大きくなるとタンパク質粒 子間の静電的反発力が増強して粒子間空隙の大きい、 すなわち空隙率の大きなゲル状ケーク層が形成され、 濾過流束が増加するということを示唆する。したがっ て、J,とζ電位の絶対値は相関づけられるといえる。 Figs.8および9の結果より、本実験で使用した限外 濾過膜の場合のBSA高分子溶液に対する定常流束J, とζ電位の絶対値 | ζ | の相関関係は近似的に次の実 験式で表されることがわかった。

$$\begin{aligned} J_t &= 0.81 \times 10^{-6} - 4.82 \times 10^{-10} |\zeta| \\ &+ 1.00 \times 10^{-9} |\zeta|^2 \end{aligned} \tag{4}$$

ここに、J,およびくの単位はそれぞれ[m^{*}/(m^{*}.s)]、 [mV]である。なお、くの適用範囲は約±32mVの範 囲内である。また、上式は実測値に対して約±10%の 誤差範囲内で一致する。

言

結

タンパクコロイド溶液の限外濾過法における定常状 態での膜透過流束は溶液のpH環境の影響を受け、定 常濾過流束は、pHに依存するタンパク質粒子の荷電 状態を表すゼータ電位の大きさと相関づけられること を実験的に明らかにした。すなわち、粒子間の静電的 反発力による濾過ケーク層構造に基づいて、ゼータ電 位が0の等電点において最小濾過流束となり、ゼータ 電位の絶対値の大きさが増加するとともに濾過流束は 増大するようになる。したがって、タンパク質溶質の 種類が決まればゼータ電位とpHの関係は一意的に決 まるので、この関係を測定しておけば、溶液のpH環 境を変化させることによって定常濾過流束を制御した り、推定することができることがわかった。

[謝辞] 本研究は、一般設備経費による電気泳動光 散乱光度計の利用によるところが大きく、また、研究 内容については名古屋大学工学部分子化学工学科 入 谷英司助教授に助言を頂いた。ここに記して謝意を表 す。

使用記号

Сь	=concentration of solute in bulk $[kg/m^3]$
Cm	=concentration of solute at
	membrane surface [kg/m³]
Сp	=concentration of solute in permeate
	[kg/m ³]
D	=dielectric constant [F/m]
J	=volume flux through membrane
	$[m^{3}/(m^{2}, s)]$
J t	=terminal value of J $[m^3/(m^2, s)]$
Р	=filtration pressure [kPa]
рΗ	= potential of hydrogen [-]
R	=solute rejection of membrane defined by
	Eq.(1) [-]
Robs	=observed value of R defined by Eq.(2)
	[-]

t	=filtration time	[min]
α	=electrophoretic mobility	[m²/(V. s)]
μ	=viscosity of liquid	[Pa. s]

 ζ =Zeta potential [mV], [V]

引用文献

- 油川,吉田: "微粒子分散系の分離工学", pp. 274, 304, 化学工業社 (1992)
- 2) Iritani, E., S. Nakatsuka, H. Aoki and T. Murase: J. Chem. Eng, Japan, 24 (2),177 (1991)
- Iritani, E., T. Watanabe and T. Murase : J. Membrane Sci, 69, 87 (1992)

- 4) Palacek, S. P. and A. L. Zydney : Biotechnol. Prog., 10, 207 (1994)
- 5)入谷,豊田,村瀬:化学工学会第28回秋季大会研 究発表講演要旨集,第1分冊, p.88 (1995)
- 6)向井,入谷,村瀬:化学工学会第28回秋季大会研 究発表講演要旨集,第1分冊,p.89 (1995)
- 7) 化学工学協会: "化学工学便覧, 改訂 5 版", pp. 696, 924, 丸善(1988)
- 8) 化学工学会: "濾過技術", p.132, 槙書店 (1984)
- 9) Kitahara, A. and A. Watanabe (eds.) : "Electrical Phenomena at Interfaces", p.106, Marcel Dekker Inc. (1984)

(受理年月日 1996年 9 月27日)