



УДК 678.675

Влияние природы и концентрации ионогенных групп на сорбционные и разделительные свойства ультрафильтрационных мембран на основе ароматических полиамидов по отношению к лизоциму

Смирнова Н.Н., Небукина И.А.

*Владимирский государственный университет
им. Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, Владимир*

Поступила в редакцию 25.06.2013 г.

Аннотация

В статье приведены результаты исследований сорбции лизоцима в статическом режиме и в условиях ультрафильтрации мембранами на основе поли-*m*-фениленизофталамида, сополимеров *m*-фениленизофталамида различного состава, содержащих фрагменты с сульфонатными группами и смеси поли-*m*-фениленизофталамида с сополимером акрилонитрила с ДМДААХ. Показано, что доминирующими силами, определяющими взаимодействие белок/мембрана в рассматриваемых системах, являются кулоновские силы, однако вклад гидрофобных взаимодействий существенен. Наличие кулоновских сил отталкивания в системе белок/мембрана способно обеспечить оптимальное сочетание таких свойств мембранных образцов как селективность и проницаемость.

Ключевые слова: ароматические полиамиды, мембраны, сорбция, разделение, лизоцим

Investigation results of sorption of lysozyme by membranes based on poly-*m*-phenylenisophthalamide, co-polymers of *m*-phenylenisophthalamide of different composition with sulfonate-containing fragment and mixtures of poly-*m*-phenylenisophthalamide with co-polymer acrylonitrile with dimethyldiallylammonium chloride in static mode and under ultrafiltration condition have been presented. It has been shown that the Coulomb forces are the dominant ones that define the protein/membrane interaction in the given systems, but the contribution of hydrophobic interactions is also sufficient. It is the repulsion of Coulomb forces in the system protein/membrane that can assure the optimum compromise of such membrane properties as selectivity and permeability.

Keywords: aromatic polyamides, membranes, sorption, separation, lysozyme

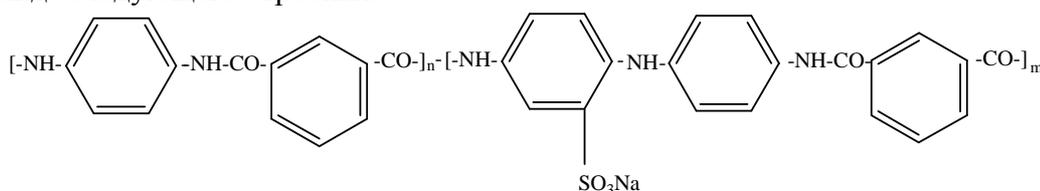
Введение

Согласно существующим представлениям в основе реализуемого при ультрафильтрации разделительного механизма лежит размерная селективность [1]. Однако в случае фильтрации белковых растворов наблюдается ряд специфических закономерностей, определяемых как особенностями состава и строения макромолекул белков, их конформационного состояния и структуры, так и характером взаимодействий белок/мембрана. Следствием этого является значительный вклад сорбционных процессов в разделительные и транспортные свойства мембранных материалов [2-5].

Для определения природы взаимодействий в системе белок/мембрана и выявления факторов их регулирования в настоящей работе поведено исследование сорбции лизоцима на серии синтезированных пористых мембран на основе ароматических полиамидов, отличающихся наличием, природой и концентрацией ионогенных групп. Выбор в качестве мембранообразующего материала ароматических полиамидов обусловлен широко известными преимуществами этого класса полимеров, а частности, их повышенной механической прочностью, высокой теплостойкостью, хорошей устойчивостью к химической и термоокислительной деструкции, что в сочетании с высокими транспортными и разделительными характеристиками определяет их активное использование для изготовления пористых полимерных мембран [6 - 8].

Эксперимент

В работе использовали полученные фазоинверсионным методом мокрого формования образцы ультрафильтрационных мембран на основе поли-*m*-фениленизофталамида (ПА), синтезированных в ОАО «Полимерсинтез» под руководством Ю.А.Федотова функционализированных сополимеров ароматического полиамида следующего строения:



$n = 99, m = 1$ мол.% (ПА-1(-))

$n = 97, m = 3$ мол.% (ПА-3(-))

$n = 95, m = 5$ мол.% (ПА-5(-))

$n = 90, m = 10$ мол.% (ПА-10(-))

и смеси поли-*m*-фениленизофталамида с сополимером акрилонитрила с ДМДААХ с 10 мол.% фрагментов с четвертичными аммониевыми группами (ПА-10(+)).

Характеристики полученных мембран: проницаемость, точка проскока пузырька воздуха и величина номинально отсекаемой молекулярной массы (по методике, представленной в работе [9]) соответствуют характеристикам, типичным для ультрафильтрационных мембран. Проницаемость мембран по бидистиллированной воде при $p = 0.1$ МПа составила от 0.65 до 0.90 мл/мин·см². Точка проскока пузырька воздуха ~ 7.5 атм. Номинально отсекаемая молекулярная масса 32–45 кДа (коэффициент задержания 0.9).

Электроповерхностные свойства мембран исследовали по методике, изложенной в работе [10]. В зависимости от состава полимерной композиции, на основе которой была получена мембрана, величина ее ζ – потенциала варьировалась от +2.4 мВ до -43.8 мВ (таблица 1).

Таблица 1. Электроповерхностные свойства полиамидных мембран

Мембрана	ПА	ПА-1(-)	ПА-3(-)	ПА-5(-)	ПА-10(-)	ПА-10(+)
ζ – потенциал, мВ	+2.4	-5.3	-14.7	-25.5	-43.8	+9.5

Сорбцию белка мембранными образцами изучали как в статическом режиме, так и в режиме ультрафильтрации. Исследования проводили с использованием лизоцима куриных яиц (*Lys*) фирмы “AppliChem” (Германия) молекулярной массы 14.4 кДа. Белок содержит 7 – 10 свободных отрицательно заряженных карбоксильных групп (аспаргиновой и глутаминовой кислот) и 17 - 19 положительно заряженных аминогрупп, 11 из которых гуанидиновые группы аргинина [11]. Такое соотношение отрицательно и положительно заряженных ионогенных групп определяет значение *pI* белка, равное 11.0 [11]. Молекула *Lys* представляет собой вытянутый эллипсоид вращения с осями 35 и 45 Å [12].

В случае статического сорбционного эксперимента использовали образцы мембран площадью 1 - 2 см². Объем раствора белка составлял 2.5 мл. Для приготовления растворов применяли фосфатный буфер с *pH* равным 6.86. Для изучения влияния ионной силы на процесс сорбции белка использовали растворы хлорида калия с концентрацией 0.05М, 0.1М и 0.5М. Сорбционные свойства мембран оценивали по изменению содержания белка в растворах после выдерживания в них образцов до установления равновесия. Концентрацию *Lys* определяли с использованием спектрофотометра СФ-2000 по оптической плотности при длине волны $\lambda = 277$ нм.

Исследования разделительных характеристик мембран в условиях ультрафильтрации белковых растворов проводили с использованием тупиковой разделительной ячейки. Рабочее давление в ходе экспериментов составляло 0.1 МПа, концентрация белка в буферном растворе при соответствующем значении *pH* равна 0.2 г/л. Эффективная площадь мембраны 11.34 см², объем ячейки 150 мл. Давление в системе поддерживали с помощью сжатого азота. Сорбционную емкость мембраны в процессе ультрафильтрации (S_{UF}) оценивали с учетом концентрации белка в концентрате и фильтрате.

Селективность мембран определяли по формуле:

$$R = \frac{c_0 - c_f}{c_0} \cdot 100\%$$

где c_0 и c_f – концентрация белка в исходном фильтруемом растворе и фильтрате соответственно, г/л.

Обсуждение результатов

Влияние природы и концентрации ионогенных групп на сорбцию лизоцима полиамидными мембранами

Изотермы сорбции лизоцима мембранами были получены при *pH*=6.86 (рис. 1), т.е. в условиях, когда макромолекулы белка заряжены положительно. Результаты, представленные на рис.1, указывают на наличие взаимосвязи сорбционной емкости исследованных образцов с природой содержащихся в них функциональных групп и корреляцию значений *S* с концентрацией этих групп в материале.

В рассматриваемой серии полиамидных мембран, наибольшие значения *S* получены для образцов, содержащих свободные сульфонатные группы (рис. 1 кривые 1 - 4) и имеющих отрицательные значения ζ – потенциала поверхности (табл. 1). В ряду сульфонатсодержащих мембран увеличение концентрации ионогенных групп сопровождается ростом величины *S*.

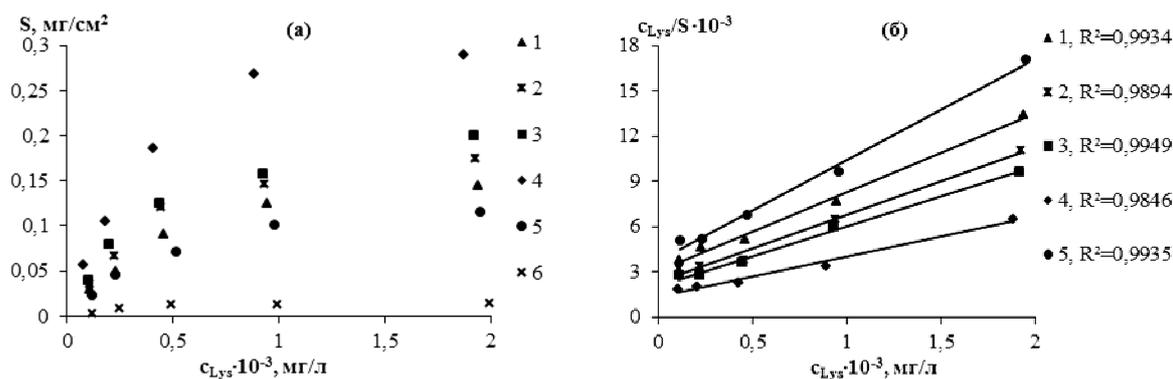


Рис.1. Экспериментальные изотермы сорбции лизоцима полиамидными мембранами (а) и их преобразование в соответствии с моделью Ленгмюра (б): 1 – ПА-1(-), 2 – ПА-3(-), 3 – ПА-5(-), 4 – ПА-10(-), 5 – ПА, 6 – ПА-10(+); $T = 20^{\circ}\text{C}$.

Минимальную сорбционную емкость имеет образец ПА-10(+) с четвертичными аммониевыми группами (рис. 1 кривая б), для которого характерно положительное значение ζ -потенциала (табл. 1). Полученные данные указывают на значительную роль электростатических сил (притяжения и отталкивания) в механизме сорбционного процесса с участием исследованных мембран.

Однако достаточно высокое значение S для мембраны ПА (рис. 1 кривая 5) свидетельствует о необходимости учета при прогнозировании сорбционной активности рассматриваемых материалов наряду с кулоновскими силами взаимодействия неэлектростатической природы.

Определяя механизм сорбции белка полимерными мембранами, авторы работы [3] указывали на возможность реализации между белком и мембраной и между макромолекулами сорбированного белка электростатических, Ван-дер-Ваальсовых, гидрофобных, гидрофильных, структурных и стерических взаимодействий. Однако сравнительная оценка вклада в общую энергию взаимодействия неэлектростатических и кулоновских сил (как притяжения, так и отталкивания) позволила сделать однозначный вывод о доминировании последних (при их наличии в системе белок/мембрана). К похожим выводам пришли авторы и других исследований [13, 14].

Представленные на рис. 1 экспериментальные результаты вполне согласуются с основными выводами относительно роли электростатических сил в процессе сорбции белков, сформулированными в работах [3, 13, 14].

Результаты математической обработки экспериментальных данных показали наличие хорошего соответствия полученных изотерм сорбции модели Ленгмюра (рис. 1 (б)):

$$\frac{c}{S} = \frac{1}{b \cdot Q} + \frac{c}{Q}$$

где S – равновесная сорбционная емкость мембраны, $\text{мг}/\text{см}^2$; c – концентрация белка в растворе на момент равновесия, $\text{мг}/\text{л}$; Q – расчетное значение максимальной сорбции, $\text{мг}/\text{см}^2$; b – коэффициент сродства в системе сорбат/сорбент, $\text{л}/\text{мг}$.

В табл. 2 представлены коэффициенты изотерм сорбции L_{ys} рассматриваемыми мембранами. Наблюдаемые закономерности изменения коэффициентов Q и b в изученных системах вполне логичны и указывают на повышение сорбционной емкости и рост сродства белок/мембрана при наличии и увеличении концентрации сульфонатных групп в сополимере ароматического

полиамида, на основе которого были получены соответствующие мембранные образцы.

Таблица 2. Коэффициенты изотерм сорбции Lys полиамидными мембранами (модель Ленгмюра)

Мембрана	ПА	ПА-1(-)	ПА-3(-)	ПА-5(-)	ПА-10(-)	ПА-10(+)
Q , мг/см ²	0.150	0.191	0.224	0.254	0.378	0.017
$b \cdot 10^3$, л/мг	1.78	1.71	1.95	1.91	1.99	1.62

Влияние ионной силы и температуры на сорбцию лизоцима

Результаты исследования влияния ионной силы раствора и температуры на процесс сорбции белка полиамидными мембранами приведены на рис. 2 и 3.

Известно, что характер зависимости сорбционной емкости мембран от ионной силы белкового раствора будет определяться свойствами как мембраны, так и сорбируемого белка и в некоторой степени является специфической особенностью конкретной исследуемой системы белок/мембрана [14, 15].

Тем не менее, можно выделить ряд общих закономерностей, установленных ранее для белоксодержащих систем [16, 17].

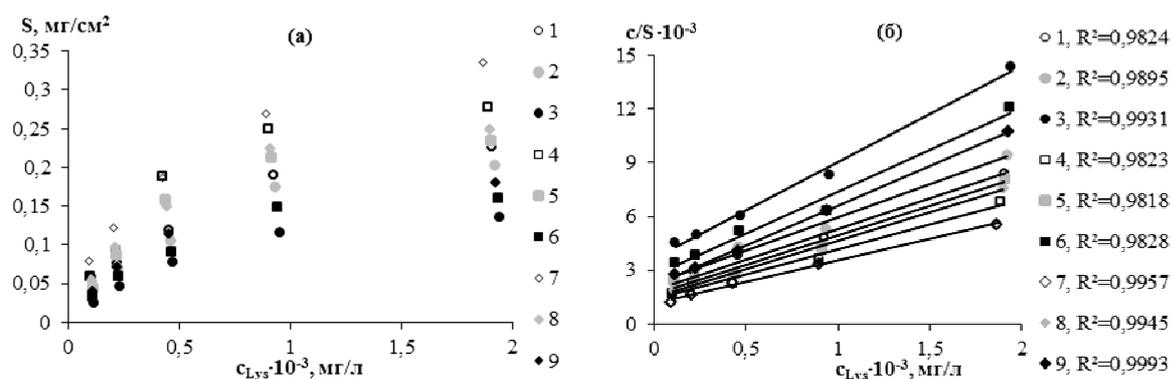


Рис. 2. Экспериментальные изотермы сорбции лизоцима полиамидными мембранами ПА (1, 2, 3), ПА-5(-) (4, 5, 6), ПА-10(-) (7, 8, 9) (а) и их преобразование в соответствии с моделью Ленгмюра (б): водный раствор (1, 4, 7), $c_{KCl} = 0.05M$ (2, 5, 8), $c_{KCl} = 0.5M$ (3, 6, 9); $T = 20^\circ C$.

Как показали подробные исследования растворов полиэлектролитов, присутствие нейтральных солей в небольших концентрациях способствует росту степени ионизации ионогенных групп макромолекул. Данное явление должно приводить к некоторому увеличению сорбционной емкости мембран в том случае, когда кулоновские силы притяжения белок/мембрана доминируют в реализуемом в исследуемой системе сорбционном механизме.

Дальнейший рост содержания низкомолекулярного электролита в растворе приводит к снижению электростатического взаимодействия макромолекул белка и ионогенных групп сорбента за счет экранирующего действия низкомолекулярной соли. Значительная концентрация низкомолекулярных электролитов способствует разрушению гидратных оболочек белковых глобул, влияя на интенсивность гидрофобных взаимодействий и процесс их ассоциации. В литературе отсутствуют четкие количественные характеристики, определяющие границы доминирования того или иного из вышеобозначенных процессов. Их значения будут зависеть как от природы сорбируемого белка, так и от свойств исследуемых мембран.

Во всех изученных системах с ростом ионной силы раствора в рассматриваемом диапазоне концентраций KCl сорбционная емкость образцов снижалась. Причем для мембраны $ПА$ эта тенденция выражена в меньшей степени (рис. 2 (а) кривые 1 - 3), чем для образцов $ПА-5(-)$ и $ПА-10(-)$ (рис. 2 (а) кривые 4-6 и 7-9 соответственно).

Выявленные закономерности свидетельствуют о доминировании второго типа из вышеобозначенных процессов, определяющих характер влияния ионной силы раствора на сорбцию белка полиамидными мембранами. Полученные данные отчасти можно рассматривать как подтверждение сделанного ранее заключения относительно роли кулоновских сил в сорбционном механизме, реализуемом в изученных системах белок/мембрана. Коэффициенты изотерм сорбции L_{ys} полиамидными мембранами при различных значениях ионной силы растворов приведены в табл. 3.

Таблица 3. Коэффициенты изотерм сорбции L_{ys} полиамидными мембранами при различных концентрациях KCl (модель Ленгмюра)

Мембрана	$ПА$			$ПА-5(-)$			$ПА-10(-)$		
	-	0.05	0.5	-	0.05	0.5	-	0.05	0.5
Q , мг/см ²	0.293	0.270	0.185	0.356	0.306	0.213	0.411	0.316	0.225
$b \cdot 10^3$, л/мг	1.80	1.64	1.47	2.09	1.96	1.73	2.16	2.15	2.08

Исследование температурных зависимостей сорбции белковых макромолекул представляет значительный интерес для установления вклада гидрофобных взаимодействий в сорбционную активность образцов. Известно, что рост температуры способствует их усилению [18]. Однако в работе [19] указано на необходимость дополнительного учета роли диффузионного фактора для интерпретации результатов исследования влияния температуры на процесс сорбции белка пористыми сорбентами.

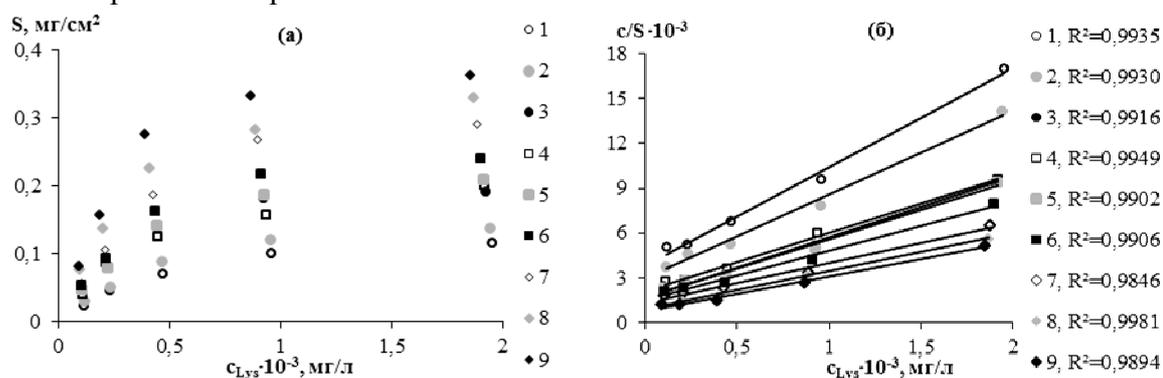


Рис.3. Экспериментальные изотермы сорбции лизоцима полиамидными мембранами $ПА$ (1, 2, 3), $ПА-5(-)$ (4, 5, 6), $ПА-10(-)$ (7, 8, 9) (а) и их преобразование в соответствии с моделью Ленгмюра (б): $T = 20^{\circ}C$ (1, 4, 7), $T = 30^{\circ}C$ (2, 5, 8), $T = 40^{\circ}C$ (3, 6, 9); $pH = 6.86$

Полученные при 20, 30 и 40°C сорбционные зависимости свидетельствуют о росте сорбционной емкости полиамидных мембран в рассматриваемом диапазоне температур. Причем для мембраны $ПА$ наблюдаемая тенденция изменения S с ростом температуры выражена в большей степени (рис. 3 (а) кривые 1-3), чем для образцов $ПА-5(-)$ и $ПА-10(-)$ (рис. 3 (а) кривые 4-6 и 7-9 соответственно).

Учитывая соотношение размера пор исследуемых мембран и макромолекул сорбируемого белка, можно полагать, что характер зависимости сорбционной емкости образцов от температуры в рассматриваемых системах белок/мембрана обусловлен, прежде всего, существенной ролью реализуемых в них гидрофобных взаимодействий. В табл. 4 представлены коэффициенты изотерм сорбции L_{us} полиамидными мембранами при различных температурах.

Таблица 4. Коэффициенты изотерм сорбции L_{us} полиамидными мембранами при различных температурах (модель Ленгмюра)

Мембрана	ПА			ПА-5(-)			ПА-10(-)		
	20	30	40	20	30	40	20	30	40
$T, ^\circ\text{C}$	20	30	40	20	30	40	20	30	40
$Q, \text{мг}/\text{см}^2$	0.150	0.178	0.247	0.254	0.257	0.301	0.378	0.394	0.431
$b \cdot 10^3, \text{л}/\text{мг}$	1.78	1.89	2.44	1.91	2.30	2.28	1.99	2.84	3.19

Итак, результаты, полученные в ходе проведенных сорбционных экспериментов, указывают на необходимость учета при прогнозировании сорбционной активности полиамидных мембран кулоновских сил и гидрофобных взаимодействий как основных видов взаимодействий, определяющих механизм сорбции белка в рассматриваемых системах.

Разделительные свойства полиамидных мембран

Результаты исследования сорбционных (в условиях ультрафильтрации) и разделительных свойств мембран представлены в табл. 5.

Таблица 5. Сорбционные и разделительные свойства полиамидных мембран в процессе ультрафильтрации

Мембрана	ПА	ПА-1(-)	ПА-3(-)	ПА-5(-)	ПА-10(-)	ПА-10(+)
$R, \%$	90.0	92.5	87.5	80.0	84.0	84.5
$S_{UF}, \text{мг}/\text{см}^2$	0.030	0.040	0.054	0.063	0.110	0.012

Сравнительная оценка полученных данных позволила выявить ряд закономерностей. В обеих рассматриваемых сериях сорбционных экспериментов (статические условия и условия ультрафильтрации белковых растворов) прослеживается зависимость наличия, природы и концентрации ионогенных групп в мембране и ее сорбционной активности. Максимальная сорбционная емкость (рис. 1(а), табл. 5) наблюдается для мембраны ПА-10(-). Именно для этого образца характерно наиболее существенное снижение проницаемости в условиях ультрафильтрации.

Минимального снижения проницаемости при наименьшей сорбционной емкости (при сопоставимых значениях R) (рис. 1 (а), табл. 5) удается достигнуть в случае использования в процессе разделения мембраны ПА-10(+).

Полученные результаты указывают на определяющую роль электростатического взаимодействия белок/мембрана в механизме засорения мембран, включающих ионогенные группы, и, как следствие – влияние кулоновских сил притяжения/отталкивания на транспортные свойства образцов.

Возникновение сил отталкивания при взаимодействии макромолекул белка с поверхностью мембраны способно обеспечить оптимальное сочетание селективности и проницаемости исследованных образцов. Наибольшей

эффективности в полиамидных мембранах удалось достичь при концентрации фрагментов с ионогенными группами, составляющей 10 мол.%.

Заключение

Проведенный сравнительный анализ сорбции лизоцима серией ультрафильтрационных мембран на основе ароматических полиамидов позволил определить роль электростатических и неэлектростатических сил в механизме сорбции сорбат/сорбент.

Показано, что характер взаимодействия белок/мембрана и сорбционная активность мембран в процессе ультрафильтрации в значительной степени определяют их разделительные и транспортные свойства.

Понимание основных закономерностей сорбционных и разделительных процессов в исследованных системах открывает возможность получения мембран с высокими характеристиками, реализуемыми как при фильтрации растворов индивидуальных модельных белков, так и реальных белковых смесей.

Список литературы

1. Мулдер М. Введение в мембранную технологию. М.: Мир. 1999. 513 с.
2. Jordanskii A.L., Markin V.S., Razumovsky L.P., Kosenko R.Y., Tarasova N.A., Zaikob G.E. Diffusion model of protein adsorption an effect of protein layer composition on water permeability for ultrafiltration membranes // *Desalination*. 1996. 104. № 1-2. . 113-118.
3. Salgin S., Takac S., Ozdamar T. Adsorption of BSA on polyether sulfone ultrafiltration membranes: Determination of interfacial interaction energy and effective diffusion coefficient // *J. Membr. Sci.* 2006. 278. № 1-2. P. 251-260.
4. Chan R., Chen V. Characterization of protein fouling on membranes: opportunities and challenges // *J. Membr. Sci.* 2004. 242. № 1 - 2. P. 169 – 188.
5. Norde W., Luklema J. Why proteins prefer interfaces // *J. Biomater. Sci. Polymer. Ed.* 1991. Vol. 2. P. 183- 202.
6. Ramachandhran V., Ghosh A.K., Prabhakar S., Tewari P.K. Separation behavior of composite polyamide membranes from mixed amines: effects of interfacial reaction condition and chemical post-treatment // *Separ. Sci. and Technol.* 2009. 44. № 3. P. 599-614.
7. Hurwitz G., Guillen G.R., Hoek E.M.V. Probing polyamide membranes surface charge, zeta potential, wettability and hydrophilicity with contact angle measurements // *J. Membr. Sci.* 2010. 349. № 1- 2. P. 349-357.
8. Xu J., Feng X., Gao C. Surface modification of thin-film-composite polyamide membranes for improved reverse osmosis performance // *J. Membr. Sci.* 2011. 370. № 1-2. P. 116 – 123.
9. Черкасов А.Н. Экспресс-анализ структуры ультрафильтрационных мембран в ходе их разработки // *Мембраны. Серия Критические технологии*. 2002. № 14. С. 3-7.
10. Березкин В.В., Киселева О.А., Нечаев А.Н., Соболев В.Д., Чураев Н.В. Электропроводность растворов KCl в порах ядерных фильтров и их электроповерхностные свойства // *Коллоидный журнал*. 1994. 56. № 3. С. 319-325.
11. Lehninger A.L. *Biochemistry*. New York: Worth Publ. 1972.
12. Phielips D.C. *Lysozyme*. New York: Acad. Press. 1974.

13. Li W., Li S. A study on the adsorption of BSA onto electrostatic microspheres: role of surface groups // *J. Colloids and Surfaces*. 2007. 295. № 1 - 2. P. 159- 164.
14. Molek J., Ruanjaikaen K., Zydney A. Effect of electrostatic interactions on transmission of PEGylated proteins through charged ultrafiltration membranes // *J. Membr. Sci.* 2010. 353. № 1- 2. P. 60-69.
15. Jones K.L., O'Melia Ch.R. protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effect of pH and ionic strength // *J. Membr. Sci.* 2000. 165. № 1- 2. P. 31-46.
16. Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. М.: Химия. 1965. 772 с.
17. Tsuchida E., Abe K. Polyelectrolyte complexes // *Developments in ionic polymers*: London, New York. 1983. P. 191-266.
18. Vasheghani F., Rajabi F.H., Ahmadi M.H., Nouhi S. Stability and thermodynamic parameters of some selective intermacromolecular complexation // *Polymer Bulletin*. 2006. Vol. 56. P. 395- 404.
19. Копас Т., Bozgeyik K., Yener J. Effects of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide // *Colloids and Surfaces. A*. 2008. 322. № 1-3. P. 19-28.

Смирнова Наталья Николаевна – к.х.н., доцент кафедры химии, Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых, Владимир, тел. +8(4922)479-867

Небукина Ирина Александровна - аспирантка кафедры химии, Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых, Владимир

Smirnova Natalya N. – the lecturer of chemistry department, Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletovs, Vladimir, smirnovann@list.ru

Nebukina Irina A. – post graduate of the chair of chemistry department, Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletovs, Vladimir