

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ ТРЕКОВЫЕ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИОННЫЕ МЕМБРАНЫ

А.Н. Нечаев, П.Ю. Анель^{}, А.Н. Черкасов^{**}, А.Е. Полоцкий^{**},
Н.В. Первов, Д.А. Трофимов, А.В. Сергеев, Б.В. Мchedlishvili*

Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва
^{*} Лаборатория ядерных реакций им. Г.Н. Флерова,
Объединенный институт ядерных исследований, Дубна
^{**} ГНЦ "Государственный научно-исследовательский институт
особо чистых биопрепаратов" Минздрава РФ, Санкт-Петербург

Проведен комплексный анализ структурно-селективных свойств асимметричных ультрафильтрационных мембран из полиэтилентерефталата и поликарбоната с эффективным диаметром пор в селективном слое 15-20 нм. Установлено место этого типа трековых мембран (ТМ) в ряду современных ультрафильтрационных мембран. Полученные асимметричные ТМ обладают более высокой (в десятки раз) производительностью в процессах ультрафильтрационного разделения высокомолекулярных веществ, чем ТМ обычного типа. Разработаны методы модификации ТМ комплексообразующими водорастворимыми полимерами, позволяющие значительно снизить адсорбцию биологически активных веществ на их поверхности и повысить степень регенерируемости ТМ. Показана возможность использования нового типа ультрафильтрационных ТМ в технологии получения биопрепаратов.

Ключевые слова: асимметричные трековые мембраны, ультрафильтрация, модификация, поверхностно-активные вещества, белки.

The complex analysis of the structure-selective properties of asymmetric ultrafiltration membranes from polyethylene terephthalate and polycarbonate with effective pore size in selective layer was 15-20 nm was carried out. The track membranes obtained had higher (by dozens of times) productivity in the processes of ultrafiltration separation of high-molecular compounds in comparison with the one of the traditional TM. The methods of the TM modification with complexing water-soluble polymers was developed. The modification methods allowed both to decrease the biologically active substances adsorption on the membranes surface and raise the TM regeneration. It was shown, that the new ultrafiltration TM could be used in the biotechnology.

Key words: asymmetric track membranes, ultrafiltration, modification, surface-active substances, proteins.

1. Введение

Среди большого разнообразия пористых полимерных мембран, используемых в биотехнологии, особое место занимают трековые мембраны (ТМ). Высокая химическая и термическая стабильность, прочность, а также узкое распределение пор по размерам определили их применение в процессах прецизионного микрофильтрационного разделения различного рода коллоидных растворов и сложных смесей биополимеров [1]. Другим направлением возможного использования ТМ является область ультрафильтрации, т.е. разделение макромолекулярных растворов. Однако в этой области ТМ еще не нашли своего применения. Это иногда связано с довольно низкой производительностью ТМ в

ряде баромембранных процессов разделения сложных смесей биополимеров. Создание высокопроизводительных трековых ультрафильтров (ТУФ) позволит ввести их в научную и технологическую практику. Как показывает опыт собственных исследований и анализ литературных данных, синтез асимметричных ТМ с тонким (100-1000 нм) селективным слоем поможет решить эту проблему [2].

2. Синтез, строение поровой структуры и свойства новых типов ультрафильтрационных трековых мембран

Асимметричные ТМ были получены из полиэтилентерефталатных (ПЭТФ) и поликарбонатных (ПК) пленок толщиной от 10 до 23 мкм,

облученных ускоренными ионами ^{84}Kr на циклотроне У-400 ЛЯР им. Г.Н. Флерова ОИЯИ (Дубна). Плотность треков в облученных пленках составляла $(2-5) \cdot 10^9 \text{ см}^{-2}$. Облученные ионами пленки были протравлены в щелочных растворах, содержащих небольшие количества (0,01-0,05%) поверхностно активных веществ (ПАВ). ПАВ, добавленные в раствор, адсорбируются на поверхности полимерной пленки и уменьшают ее уязвимость к химической атаке травителем. Кроме того ПАВ оказывают существенное влияние на процесс травления трека: их молекулы проникают в трек значительно медленнее, чем молекулы травителя, в результате чего ПАВ локализуется у входа в пору, формируя узкое "горлышко" протравливаемого канала [3, 4]. Проводя процесс в асимметричных условиях, мы получили ТМ с тонким селективным слоем на одной из сторон пленки. В качестве ПАВ использовались додецилсульфонат натрия и поливинилпирролидон, как предложено в [4].

Трековые мембраны с тонкими селективными слоями могут тестироваться при помощи калиброванных латексных суспензий [5]. По сравнению с обычными ТМ, эквивалентными исследуемым по гидравлическому сопротивлению, новый тип мембран показал существенно более высокие коэффициенты задержки латексных частиц.

В настоящей работе для изучения структурно-селективных свойств полученных асимметричных ТУФ использовался метод их калибровки смесями модельных белков [6, 7]. Этот метод позволяет получить кривые задержания белков-калибраторов мембраной, а проведя анализ молекулярно-массового распределения задерживаемых белков – определить средний размер пор селективного слоя, распределение пор по размерам, дефектность и оценить толщину селективного слоя. Таким образом, этот метод дает возможность получить практически ту же информацию, что и с комплексным использованием различных структурно-чувствительных методов, таких как микроскопия, ртутная порометрия, термо- и порометрия, метод продавливания-фильтрации. В качестве калибраторов использовались белки с существенно различающимися молекулярными массами: триптофан, цитохром С, альбумин, гаммаглобулин, тирог-

лобулин, ферритин. Общая концентрация белка в фильтруемом растворе составляла 0,1 %. Анализ содержания белка в ретентате и пермеате осуществлялся с использованием метода эксклюзионной хроматографии.

На рис. 1 представлены кривые задержания для асимметричных ТМ с диаметром пор в селективном слое $D \approx 20 \text{ нм}$ и для традиционных ТМ, имеющих тот же диаметр пор, но цилиндрическую форму пор. В качестве сравнения представлена также кривая задержания для "совершенной" ультрафильтрационной мембраны с очень узким (монодисперсным) распределением пор – мембраны, созданной Слейтером и Сара [6]. Эти мембраны являются композиционными, в которых роль селективного слоя играют кристаллические блоки белковых компонентов клеточных оболочек бактерий, а роль подложки – микрофильтрационные ТМ с диаметром пор 100 нм. Видно, что новые трековые мембраны характеризуются так же, как и совершенные ультрафильтрационные мембраны Слейтера–Сара, значительной крутизной наклона кривой задержания белков, что свидетельствует о достаточно узком распределении пор по размерам полученных мембран. В то же время традиционные ТМ с порами в нанодиапазоне характеризуются достаточно широким их распределением по размерам. Следует отметить, что такой значительный разброс размеров пор, обнаруженный для традиционных ТМ с нанопорами, существенно отличает их от трековых микрофильтрационных мембран. Данное обстоятельство, видимо, связано с изменением кристаллической структуры

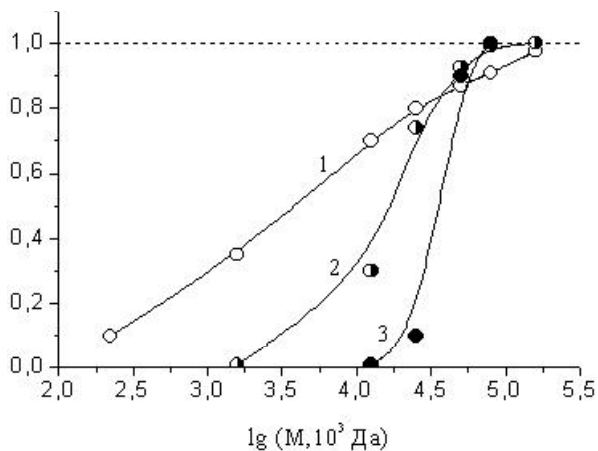


Рис. 1. Зависимость селективности от молекулярной массы белков-калибраторов. 1 – традиционные ТМ симметричной структуры, 2 – асимметричные ТМ, 3 – мембраны Слейтера-Сара.

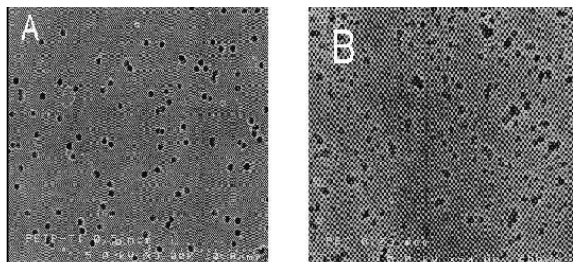


Рис. 2. Микрофотографии трековых мембран с разным размером пор. А – трековый микрофильтр с $D=500$ нм, В – трековый ультрафильтр с $D=30$ нм. Изображения получены методом растровой электронной микроскопии.

исходной полимерной пленки в процессе травления пор. Электронные микрофотографии традиционных трековых микро- и ультрафильтров представлены на рис. 2.

На рис. 3 представлена диаграмма, позволяющая провести классификацию ультрафильтрационных мембран по толщине их селективного слоя l_s , производительности G и селективности ϕ . Последняя характеризуется номинально отсекаемой молекулярной массой M_L белков (cut-off). Диаграмма такого типа была предложена в работах [7, 8]. Наклонные прямые линии соответствуют различной толщине селективного слоя ультрафильтра. Из представленной диаграммы видно, что толщина селективного слоя у традиционных ТМ равна толщине самой мембраны, а новые типы асимметричных трековых

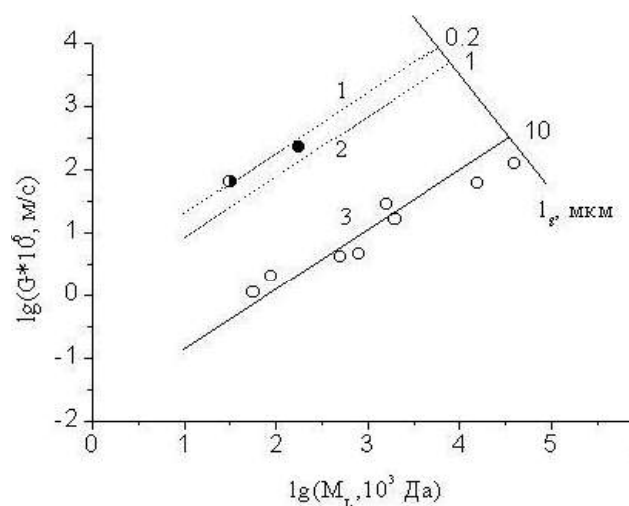


Рис. 3. Зависимость потока (при $\Delta P=0,1$ МПа) через мембрану от величины номинально отсекаемой молекулярной массы: 1 – асимметричные ТМ, 2 – мембраны Слейтера-Сара, 3 – традиционные ТМ симметричной структуры.

ультрафильтров имеют селективный слой менее 1000 нм. Особо следует отметить, что данный тип асимметричных ТМ обладает на 1÷2 порядка более высокой производительностью, чем традиционные трековые мембраны. Это позволяет отнести разработанные асимметричные ультрафильтрационные мембраны к наиболее высокопроизводительным ультрафильтрационным мембранам, созданным к настоящему времени, с диапазоном cut-off в области 20-130 кДа.

3. Новые типы ультрафильтрационных ТМ с модифицированной поверхностью

Другой важной характеристикой, влияющей на эксплуатационные свойства ультрафильтрационных мембран, является характер сорбционных взаимодействий фильтруемых макромолекул (например, белков) с поверхностью пор. Сравнительно высокая адсорбционная активность поверхности ТМ по отношению к белкам определяет быструю забивку, низкую регенерируемость этих мембран и значительные необратимые потери компонентов фильтруемой системы на их поверхности. В качестве параметра, который характеризует характер сорбционных взаимодействий белков с поверхностью ультрафильтра, может быть использован фактор восстановления потока (FRR) через мембрану после ее регенерации в десорбирующих белки растворах. Было установлено, что для трековых ультрафильтров, полученных из ПК, значение этого параметра вдвое выше, чем у мембраны из ПЭТФ. Восстановление проницаемости мембран из ПК достигает 70%, что характерно для гидрофильных, малоадсорбирующих мембран из ацетатцеллюлозы. Этим самым показано, что при производстве трековых ультрафильтров предпочтительней использование ПК пленки. Однако, адсорбция белков на ТМ может быть снижена не за счет выбора полимеров с низкой адсорбционной активностью, а за счет химического модифицирования их поверхности.

Нами была разработана модификация поверхности ТМ различными водо-растворимыми полимерами: полиэтиленгликолем (ПЭГ), поливиниловым спиртом (ПВС), поливинилпирролидоном (ПВП), гепарином. Эти полимеры широко используются в биотехнологии, медицине,

хроматографии для модификации поверхности с целью создания пористых материалов с заданными адсорбционными свойствами.

Была исследована возможность модификации поверхности ТМ из ПЭТФ за счет адсорбции вышеперечисленных полимеров. Установлено, что модифицирующие слои, полученные таким способом, гидролитически неустойчивы. Для прочного связывания водорастворимых полимеров с поверхностью нами был предложен метод модификации с использованием бифункционального связующего агента, способного к образованию химической связи как с поверхностью ТМ, так и с молекулами модификатора. В качестве такого бифункционального агента использовался полиэтиленмин (ПЭИ) – полиэлектролит, положительно заряженные аминогруппы которого способны к взаимодействию с отрицательно заряженными ионогенными группами поверхности мембраны и полимеромодификаторов. После того, как поверхность ТМ была модифицирована ПЭИ, на неё из водных растворов наносились выбранные модифицирующие полимеры.

Изучены электроповерхностные свойства модифицированных мембран в диапазоне рН от 2 до 9 и адсорбция дифильных ионогенных веществ на их поверхности. Полученные данные показывают, что использование всех предложенных вариантов модифицирования приводит к изменению заряда поверхности и снижению адсорбции модельных адсорбатов – красителя родамина С и белков (овальбумина, гемоглобина и лизоцима) на поверхности ТМ.

Уменьшение адсорбции белков на поверхности ТМ в результате модификации должно отразиться и на эксплуатационных свойствах мембран, особенно – на структурно-селективных свойствах трековых ультрафильтров.

Было обнаружено, что модифицированные мембраны по размерам пор, номинально отсекаемой молекулярной массе, толщине селективного слоя и дисперсии кривой задержания оказываются близкими к исходной мембране, то есть, модификация не меняет поровую структуру мембраны, но, что существенно, приводит к возрастанию FRR для ПЭТФ с 40% до значений 60-80%, характерных для современных гидро-

фильных ультрафильтрационных мембран с сетчатой структурой пор.

4. Практическое использование новых типов асимметричных трековых ультрафильтров в биотехнологических процессах

Асимметричные ТУФ из ПЭТФ (немодифицированные), описанные выше, были применены для обессоливания и очистки от низкомолекулярных примесей генно-инженерного фермента супероксиддисмутазы ($M=39 \cdot 10^3$ Да), полученного из дрожжей *Sacharomyces cerevisia*. Обессоливание и очистка проводились в режиме диафильтрации после стадии хроматографии. Наблюдалось снижение проницаемости мембран в 3-10 раз при хорошем восстановлении потока ($FRR=55-70\%$). Потери активности составляли 15-30% при степенях очистки (снижение уровня низкомолекулярных компонентов) 14-20 раз. Это соответствует данным, полученным при использовании других типов умеренно гидрофобных мембран из полисульфонамида, фенилона и свидетельствует о возможности применения ТУФ в технологии получения супероксиддисмутазы.

Эти же трековые ультрафильтры из ПЭТФ были применены также для обессоливания и очистки от низкомолекулярных примесей генно-инженерного фермента каталазы ($M=240 \cdot 10^3$ Да), полученного из гриба *Aspergillus*. Обессоливание и очистка проводились в режиме диафильтрации после стадии хроматографии. Наблюдалось снижение проницаемости асимметричных ТУФ из ПЭТФ в 3 раза при восстановлении потока на 50%. При 25-кратной очистке фермента от примесей было обнаружено повышение его активности в 3,5 раза что, по-видимому, обусловлено удалением низкомолекулярных ингибиторов ферментной активности при диафильтрации. Полученные данные говорят о перспективности применения асимметричных ТУФ и в технологии получения генно-инженерной каталазы.

Асимметричные ТУФ из ПЭТФ были применены также в технологиях концентрирования генно-инженерного интерлейкина 1β ($M=18 \cdot 10^3$ Да), полученного из *E.coli*, и 2- α интерферона ($M=20 \cdot 10^3$ Да), полученного из того же продуцента.

В отличие от двух первых процессов, где ультрафильтрации подвергались молекулярные растворы, прошедшие хроматографическую очистку, в двух последних процессах разделяемые смеси представляли собой сочетание компонентов разной химической природы (белки, фрагменты нуклеиновых кислот, компоненты клеточных оболочек и т.п.), обладающих повышенной сорбционной активностью. Этим можно, по-видимому, объяснить сильное падение производительности ТУФ из ПЭТФ при ультрафильтрации интерлейкина 1 β и 2- α интерферона. Потоки по этим растворам упали на 2 порядка и составили величины $(0,3-0,9) \cdot 10^{-6}$ м/с. Восстановление проницаемости составило около 10%. Полученные в этом случае данные свидетельствуют о необходимости предварительной очистки фильтруемых растворов.

5. Выводы

1. Использование поверхностно-активных веществ, добавленных в травящий щелочной раствор, позволяет получить асимметричные ультрафильтрационные трековые мембраны из полиэтилентерефталата и поликарбоната с тонкими селективными слоями.

2. Комплексное исследование полученных асимметричных ультрафильтрационных трековых мембран показало, что данный тип мембран имеет тонкий селективный слой около 0,2-0,3 мкм, эффективный диаметр пор в селективном слое 15-20 нм, диапазон номинально отсекаемой мембранами молекулярной массы составляет 20-130 кДа. Новый тип трековых мембран характеризуется узким распределением пор по размерам.

3. Проведенное сравнение эксплуатационных параметров полученных асимметричных трековых мембран и традиционных трековых мембран с изотропной структурой показало, что новый тип трековых мембран обладает на 1-2 порядка более высокой производительностью при той же селективности.

4. Модификация поверхности ультрафильтрационных трековых мембран из ПЭТФ комплексобразующими водорастворимыми полимерами, такими как ПЭГ, ПВП, ПВС позволяет существенно (от 2 до 50 раз) снизить адсорбцию белков на их поверхности, что при-

водит к возрастанию параметра FRR с 40% до 60-80%, что характерно для современных гидрофильных ультрафильтрационных мембран.

5. Можно констатировать, что трековые ультрафильтры наряду с мембранами сетчатого типа могут быть успешно применены в технологиях получения генно-инженерных биопрепаратов на стадиях очистки и обессоливания молекулярных растворов, прошедших хроматографическую очистку, но для этого они должны быть подвергнуты прежде всего структурной, а также поверхностной химической модификации.

Авторы работы благодарны Л.Г. Карпухиной и М.Ф. Кудоярову (Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН) за предоставленные образцы трековых мембран и облученных пленок.

Литература

1. Флейшер Р.Л., Прайс П.В., Уокер Р.М. Треки заряженных частиц в твердых телах. М.: Энергоиздат. 1981. Т.2, с. 115-145.
2. Нечаев А.Н., Березкин В.В., Виленский А.И., Жданов Г.С., Карпухина Л.Г., Кудояров М.Ф., Митерева А.М., Митрофанова Н.В., Пронин В.А., Цыганова Т.В., Мчедlishvili Б.В. Асимметричные трековые мембраны // Мембраны. 2000. № 6, с. 17-25.
3. Apel P.Yu., Dmitriev S.N., Root D., Vutsadakis V. A novel approach to particle tracketching: surfactant-enhanced control of pore morphology // Part. Nucl. Lett. 2000. № 4, p. 69-74.
4. Apel P.Yu., Blonskaya I.V., Didyk A.Yu., Dmitriev S.N., Orelovitch O.L., Root D., SamoiloVA L.I., Vunsadakis V.A. // Nucl. Instr. Meth. 2001. V.B179. №1, p. 55.
5. Оганесян В.Р., Орелович О.Л., Янина И.В., Апель П.Ю. // Коллоидн. журн. 2001. Т. 63. № 6, с. 825.
6. Черкасов А.Н., Пасечник В.А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия, 1991.
7. Черкасов А.Н., Власова О.Л., Царева С.В., Коликов В.С., Мчедlishvili Б.В. Ультрафильтрация на ядерных фильтрах // Коллоид. журн. 1990. №2. Т. 52, с. 323-328.
8. Черкасов А.Н. Экспресс-анализ структуры ультрафильтрационных мембран в ходе их разработки. // Мембр. 2002. № 14, с. 3-17.

