

食品由来の生体高分子の複合化と  
糖鎖ネットワークの制御による分子認識機能膜の開発

日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻  
博士後期課程

呉 鵬

2013

## 第一部 食品由来の生体高分子の可能性とその機能化

### 第1章 食品由来の構造多糖類資源の活用と機能探求

1.1 緒論	1
1.2 起源の異なる構造多糖類とその化学組成	2
1.2.1 海藻由来のカラギーナン (Carrageenan)	2
1.2.2 澱粉由来のプルラン (Pullulan)	5
1.2.3 甲殻類の殻由来のキトサン (Chitosan)	6
1.3 構造多糖類を膜素材として利用した応用研究と機能探求	8
1.4 本研究の目的	12
1.5 本研究の構成	13

## 第二部 生体高分子のネットワークの制御と化学修飾による タンパク質の高速分離膜の開発

### 第2章 表面改質を施した chitosan 膜の開発と高流束の実現

2.1 本章の背景および目的	17
2.2 実験系および解析法	17
2.2.1 供試された chitosan の内容	17
2.2.2 Silica 微粒子による Chitosan 膜表面の改質	22
2.2.3 走査型顕微鏡(SEM)による膜表面形態の観察	22
2.2.4 機械的強度の測定	22
2.2.5 純水透過流束の測定	23
2.3 実験結果および考察	25
2.3.1 Chitosan の分子量および脱アセチル化度	25
2.3.2 Silica 微粒子による改質した膜表面の形態	27
2.3.3 機械的強度の評価	28
2.3.4 純水透過性能並びに高流束の評価	29
2.4 本章の結論	33

### 第3章 表面改質 Chitosan 膜による溶媒並びにタンパク質の透過性能評価

3.1 本章の背景および目的	34
----------------	----

3.2	実験系および解析法	34
3.2.1	物質透過実験の設計	34
3.2.2	総括物質移動係数の定義	36
3.2.3	膜内の拡散現象の性能評価としての有効拡散係数	39
3.2.4	膜分離性能評価としての有効拡散係数	41
3.2.5	タンパク質による透過性能の測定	41
3.2.6	タンパク質による阻止率の測定	41
3.3	実験結果および考察	42
3.3.1	有効拡散係数に対するタンパク質の分子量の影響	42
3.3.2	タンパク質透過性能からみた表面改質の評価	45
3.3.3	タンパク質分離性能からみた表面改質の評価	47
3.4	本章の結論	48

#### 第4章 リガンドの導入により大きな分子群（タンパク質）の捕獲

4.1	本章の背景および目的	50
4.2	実験系および解析法	50
4.2.1	リガンドとしての Cibacron Blue F3GA の導入	50
4.2.2	大きな分子群（タンパク質）を対象とした吸着平衡	51
4.3	実験結果および考察	51
4.3.1	Chitosan 膜における Cibacron Blue F3GA の吸着特性	51
4.3.2	指標タンパク質(BSA)の吸着特性の評価	53
4.4	本章の結論	53

### 第三部 生体高分子の複合化による分子サイズ認識機能膜の開発

#### 第5章 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の開発と基本特性の評価

5.1	本章の背景および目的	55
5.2	実験系および解析法	56
5.2.1	架橋手法と製膜条件の検討	56
5.2.2	膜の含水率	57
5.2.3	機械的強度の測定	57
5.2.4	走査型顕微鏡（SEM）による膜構造の解析	58

5.3	実験結果および考察	58
5.3.1	$\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の製膜手法の確立	58
5.3.2	機械的強度による最適架橋条件の確定	61
5.3.3	$\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の膨潤特性と含水率	63
5.3.4	$\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )による膜の基本特性の変化	64
5.4	本章の結論	65

## 第6章 濃度差を拡散推進力とする分子サイズ認識機能の評価

6.1	本章の背景および目的	66
6.2	実験系および解析法	66
6.2.1	指標物質の選定と分子サイズの決定法	66
6.2.2	自由溶液中での拡散係数の推算	69
6.3	実験結果および考察	69
6.3.1	有効拡散係数の評価と指標物質の分子サイズの影響	69
6.3.2	$\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )による糖鎖ネットワークの制御による分子分画性能の設計	71
6.4	本章の結論	73

## 第7章 圧力差を推進力とする純水の透過性能の評価

7.1	本章の背景および目的	74
7.2	実験系および解析法	74
7.2.1	高分子膜の純水透過挙動	74
7.3	実験結果および考察	75
7.3.1	経時変化	75
7.3.2	圧力依存性	76
7.3.3	透過溶液の温度依存性	77
7.3.4	透過溶液の粘度依存性	78
7.3.5	$\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )の影響	79
7.4	本章の結論	79

## 第8章 圧力差を推進力とする指標成分を含む水溶液の透過性能

8.1	本章の背景および目的	81
-----	------------	----

8.2	実験系および解析法	82
8.2.1	色素透過実験の概要と方法	82
8.3	実験結果および考察	83
8.3.1	色素分子サイズに対する透過速度の影響	83
8.3.2	分画分子量の決定	85
8.4	本章の結論	86

## 第四部 本研究の総括

### 第9章 生体高分子膜の特性を活かした膜分離プロセスの提案

9.1	本章の背景および目的	88
9.2	本研究の表面改質 chitosan 膜と複合膜による多段膜分離プロセス	89
9.2	本章の結論	92

### 第10章 本研究の総括とオリジナリティー並びに展望

10.1	本研究の要旨	93
10.2	本研究オリジナリティーと価値	96
10.3	本研究の課題と今後の展望	97
	Nomenclature	101
	References	104
	本論文に関する研究業績	115
	謝辞	121
	原著の別刷り	124

## 第一部 食品由来の生体高分子の可能性とその機能化

### 第1章 食品由来の構造多糖類資源の活用と機能探求

#### 1.1 緒論

多糖類は多くの単糖類がグリコシド結合によって重合した高分子化合物であり、陸上高等植物および海藻中に多量に含まれ動物や微生物中に広く分布している。代表的な多糖類として、動植物の支柱や皮膜をなし構造多糖と呼ばれるセルロースやキチン、および動植物のエネルギー源となり貯蔵多糖と呼ばれるデンプンやグリコーゲンがある。他の主な多糖類としては、植物に含まれるペクチン、グルコマンナンやガラクトマンナン、褐藻類に含まれるアルギン酸、紅藻類に含まれるカラギーナンやアガロース、動物の結合組織に多く存在するヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸といったグリコサミノグリカン、微生物が生産するプルランやカードランがある。これらの他にも数多くの多糖類が存在しており、現在でも動植物や菌類がつくり出す新たな多糖類が発見され、それらの構造や生理活性が調べられている。多糖類は、地上で偏在することなく存在し、量的に豊富で多くの地域で多様な動植物から入手可能であり、親水性、改質可能といった特徴を有し、持続的に再生産される生物由来の資源である。また、安価に入手することができるため、これらを原料とする各種生産・加工プロセスは低コストが期待できる。生物学的な面では非毒性、生体適合性、生分解性といった特徴を有している。そのため多糖類は工業的にも重要な役割を占めており、食品分野では食品そのものとしてだけでなく増粘剤、ゲル化剤、安定剤として、化粧品分野では粘度調整剤や保湿剤として、医薬品分野では薬剤、ドラッグデリバリーシステムの担体や医用材料として利用されている。この他にも、紙パルプや繊維分野など様々な分野で利用されている。

多糖類のキラリティーの応用という点からは、糖鎖—物質間の不斉相互作用を利用した光学異性体の識別分離（光学分割またはキラル分離）に関する研究がある。医薬・農薬などの生理活性物質の多くはD-体・L-体の光学異性体が存在し、生体に対して異なった生理活性を示すため、両異性体を分離分析する実用的な光学分割手法が必要となる。セルロースに各種置換を施したトリフェニルカルパメート誘導体は高い光学分割能を有し、高速液体クロマトグラフィー用のキラル固定相としてすでに実用化されている。現在、多糖類誘導体の不斉識別機構の解明とともに、さらに高性能なキラリ分離材料の開発が進められてい

る。

セルロース並びに類縁多糖類は、膜状にすることによって、物質の分子サイズに応じて分離する能力に長けており、血液透析膜、浸透気化膜、気体分離膜などの用途において重要である。今後は、分子サイズ認識の高性能化はもとより、多機能を備えた膜材料の開発が進展するであろう。多糖類と他の有機素材あるいは無機素材とのハイブリッド化を利用して、高い選択吸着能・イオン交換膜・触媒能などが付与された、新規の物質分離材料の登場が期待される。

## 1.2 起源の異なる構造多糖類とその化学組成

### 1.2.1 海藻由来のカラギーナン (Carrageenan)

カラギーナンは、アイルランドの人々がアイリッシュモスを乾燥して粉末状にしたものを牛乳で煮溶かしたところ、ミルクデザートができたことが起源であるといわれている。1930年代になるとアイリッシュエクストラクトと呼ばれる抽出物が米国で製造されるようになった。その後、アイルランド南部の海藻集荷地のカラギーン(Carrageen)という地名にちなんで、Carrageein と呼ばれるよるになり、1959年の米国化学会の有機化学部会にてカラギーナン(Carrageenan)という名称が正式に採用された。

カラギーナンは、スギノリ科、ミリン科の紅藻類から熱水抽出される多糖類である。原藻は世界中に分布し、北ヨーロッパ、北米西太平洋ではツノマタ属の *Chondrus crispus* が、チリ、アルゼンチンなど南米ではスギノリ属の *Chondracanthus skottsbergii*、東南アジアやアフリカ南部ではキリンサイ属の *Kappaphycus alvarezii* や *Eucheuma denticulatum* が採取されている。カラギーナンの製造方法は、原藻を熱水抽出して濾過精製された溶液をアルコールにより沈殿させ脱水する方法と、溶液を冷却凝固させたゲルをプレス機で加圧脱水方法の2種類ある。

カラギーナンは硫酸基を含むガラクトタンという水溶性多糖類の一種である。その分子量は約 100,000 ~ 500,000 の範囲にある。ゲル化性、高粘性、分散性などの諸特性を生かして、乳製品、製菓、畜肉水産品など食品工業に利用されている。また化粧品、医薬品、その他工業用製品分野にも用いられ、今後さらに広い用途展開が期待されている。アンヒドロガラクトースのガラクトースに対する比率や硫酸エステルの数によってゲル化の性質が異なる。Figure 1-1 に示したように、カラギーナンの主鎖はガラクトースで構成されており、D-ガラクト

ースと 3,6-アンヒドロ-D-ガラクトースが交互に連なった直鎖状の多糖類で、アンヒドロガラクトースを含まずに硫酸基を多く含んだラムダ ( $\lambda$ ) タイプのもの、アンヒドロガラクトースを含み、硫酸基の少ないカッパ ( $\kappa$ ) タイプのもの、それからその中間のイオタ ( $\iota$ ) タイプのものまで主な三つのタイプがある。

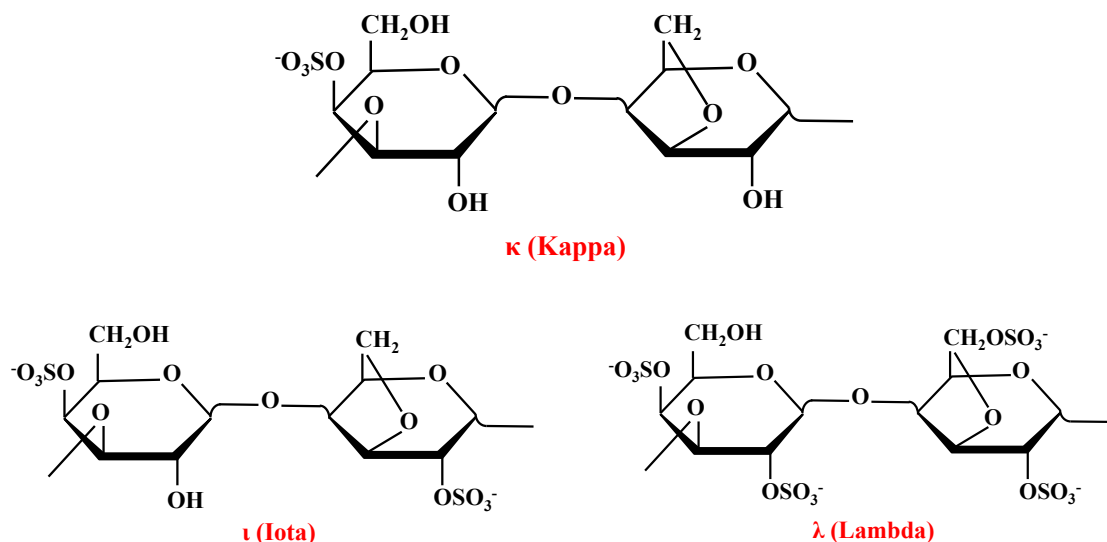


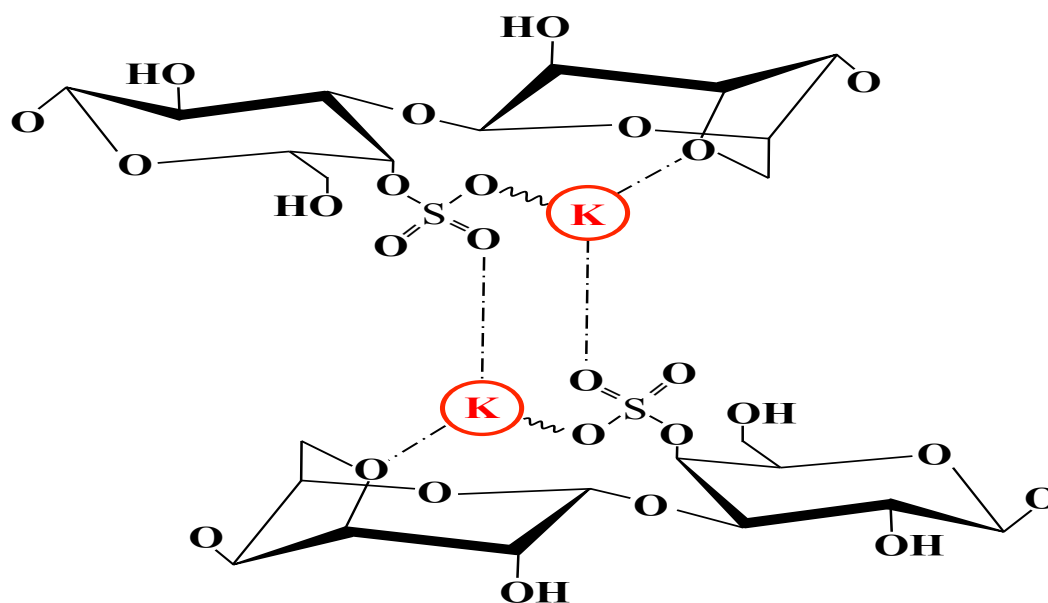
Figure 1-1 Chemical structures of three types of carrageenan.

$\kappa$  タイプは自然に広く存在し、その水溶液がゲルすることから増粘安定剤として広く用いられている。カラギーナンでは、 $\kappa$  タイプおよび  $\iota$  タイプの水溶液は低温でゲル化が観察されるが、 $\lambda$  タイプはゲル化しないといったようにカラギーナンの種類によってゲル化の能力が異なる。このようなゲル化能の違いは、カラギーナンの化学構造の違いによるものだと考えられている。このゲル化に関してはすでに多くの研究が行われており、さまざまな知見が得られている。ゲル化に影響をおよぼす因子として、 $\kappa$  カラギーナン濃度、温度、添加塩（カチオン）の種類・強度（添加塩濃度）が報告されている。

多糖類水溶液のゲル化の機構には溶液中における糖鎖の構造変化が大きく関与していると考えられている。 $\kappa$  カラギーナン水溶液においては溶液状態であるゾルでは、糖鎖は孤立鎖で存在するが、温度の低下や塩添加などの条件を加えることにより糖鎖の形態が変化し二重螺旋構造になる。いわゆる、コイルヘリックス転移がゲル化を引き起こす大きな原因とされる。さらに、この転移で形成される二重螺旋部分が、糖鎖間を結びつける役目を担う。すなわちこれが架橋点となり、系全体が見かけ上ひとつの分子となりゲル構造に至る。そして



さらに複数の二重螺旋が会合体を形成することによってより硬いゲルへと変化する。これが考えられてきたゲル化モデルである。また、共存金属カチオンは、その濃度だけではなく、種類によってもゲル化に大きな影響を与える。各カチオンを単独で添加した場合、比較的希薄な溶液では、 $\text{Li}^+$ は高濃度で低温にすればゲル化し、 $\text{K}^+$ は低濃度でも高温でも強いゲルを形成する。このように同一価のカチオンでも  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ の順にゲル化能が大きくなり、特に  $\text{K}^+$ のゲル化能は他と比較して著しく大きい (Figure 1-2)。これらのカチオン類は  $\kappa$ カラギー



ンの二重螺旋の集合を促進し、3次元のゲルネットワークを形成する。

Figure 1-2  $\kappa$ -carrageenan crosslinked by potassium ion.

$\iota$ カラギーナンはカルシウムイオンで最も強いゲルを形成する。次いではカリウムによって強いゲルを形成することができる。 $\iota$ カラギーナンのゲルは  $\kappa$ カラギーナンに比べ、弱い弾力性がある。 $\iota$ カラギーナンは  $\kappa$ カラギーナンと似たようなダブルヘリックスを形成するが、 $\iota$ カラギーナン分子上の余分の硫酸基がヘリックスの主軸から外へ突き出しており、二重螺旋の集合を妨げる立体障害になる。集合による変形が生じないため、 $\iota$ カラギーナンからは離水が生じないと考えられる。 $\iota$ カラギーナンのゲル形成は二重螺旋の段階 (Figure 1-3. Stage B) で起きる (Figure 1-3)。

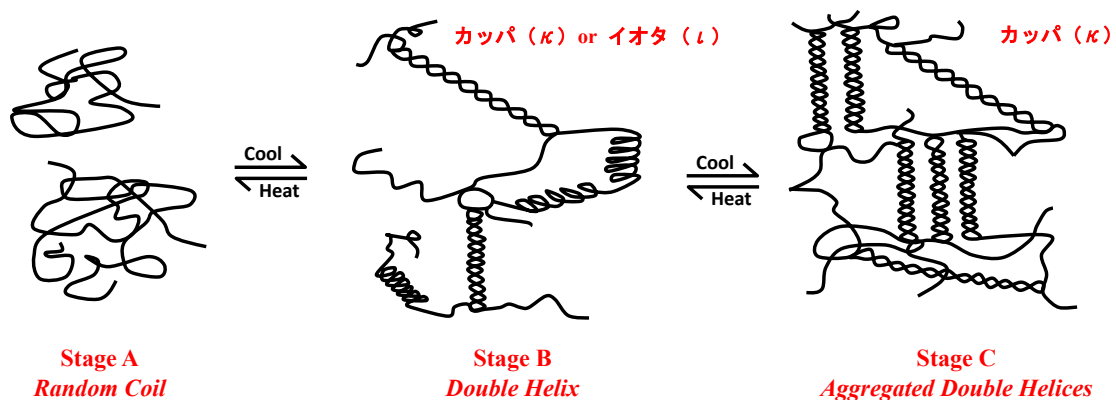


Figure 1-3 Model of conformational transition of  $\kappa$ -carrageenan and  $\iota$ -carrageenan.

### 1.2.2 澱粉由来のプルラン (Pullulan)

プルランは、黒酵母の一種、*Aureobasidium pullulans* をショ糖や澱粉分解物などを炭素源とし、適当な条件下で培養した時、培養液中に産生される粘性多糖類である。1938年、R.Bauerにより最初に報告され、当時はその生産条件や構造などの検討はなされなかったが、その後、Bender, Wallenfels 及び Ueda らにより、培養方法、構造などが研究されてきた。そして1965年、Wallenfels らにより、 $\alpha$ -1,6-グルコシド結合を特異的加水分解する酵素、プルラナーゼを用いたプルランの分解結果から、主として3個のグルコースが $\alpha$ -1,4結合したマルトトリオースの生成が見られることから、プルランはFigure1-4に示したようにマルトトリオースが $\alpha$ -1,6で繰り返し結合した直鎖上の $\alpha$ -グルカンであることが示唆された。その後、さらに詳細な構造研究が進められ、必ずしもマルトトリオース単位のみでの繰り返しではなく、所々にグルコースの四量体であるマルトテトラオースが数%含まれており、しかも $\alpha$ -1,3結合も混在するといわれているが、デキストランに見られるような分枝は全くないとされている。

培養時の条件を変えることにより、各分子量のものを得ることができるが、現在工業的には平均分子量20万のプルランを生産している。プルランは、無味無臭、白色、不定形の非結晶性粉末で、急性、亜急性、慢性毒性および変異原性試験の結果まったく問題なく、澱粉同様、表示義務、使用制限のない食品として認められている。

プルランの諸特性を生かした、食品、一般工業、生化学、医薬分野への多くの利用例がある。食品の分野において、プルランの強い接着力、固結力による食品の結着、成形、シート化、作業性の改善および顆粒化、錠剤化時のバインダーとして利用されている。また、食品表面にプルランの安定な被膜を形成させ、つや出し、内容物の酸化防止、鮮度保持、保香などの効果もあり、フィルムによる表面および内部の模様付けなどの利用もある。一般工業分野において、プルランの造膜性、水溶性を利用した、印刷用平版保護膜形成液、アート紙塗工剤、接着性を利用した、種子コートなどへの利用例がある。

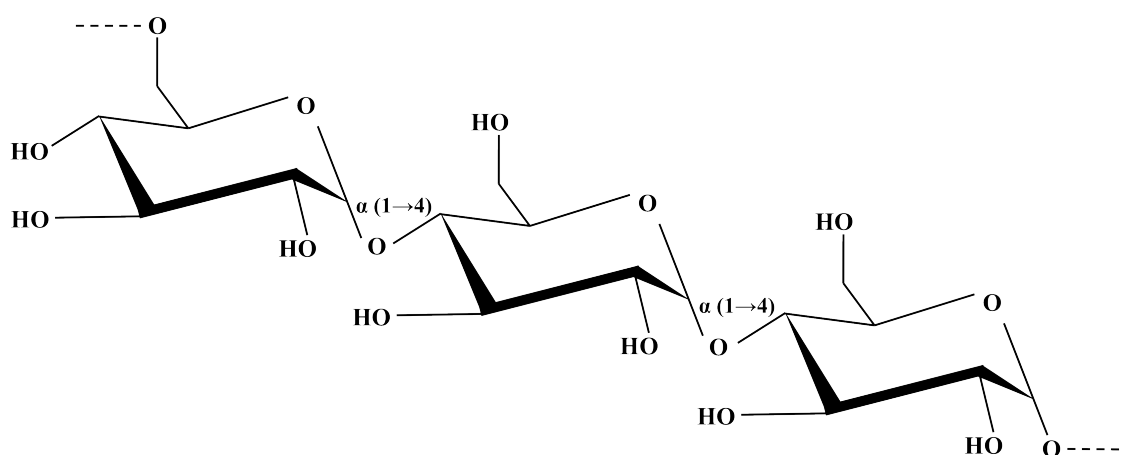


Figure 1-4 Chemical structure of pullulan.

### 1.2.3 甲殻類の殻由来のキトサン (Chitosan)

1811年、フランスの植物学者 Braconnot は、西洋キノコを希アルカリで加熱処理した際の不溶性物質をファンジン(fungine)と命名した。1823年、Odier は昆虫のクチクラ（角皮、表面の堅い部分）にもこれと類似の物質を発見し、ギリシャ語の「包むもの」を意味する言葉から、この物質をキチン(chitin)と命名した。一方、1895年、Rouget はキチンを水酸化カリウムの濃厚溶液中で加熱すると、有機酸に可溶になることを発見し、1894年、Hopper-Seyler によってこの物質はキトサン(chitosan)と命名された。

キチンは N-アセチル-D-グルコサミンが  $\beta$ -1,4-結合で直鎖状に連なった多糖、すなわち、 $\beta$ -1,4-ポリ-N-アセチル-D-グルコサミンであり、キトサンはその脱アセチル化物  $\beta$ -1,4-ポリ-D-グルコサミンと定義され、その化学構造はセルロースに酷似している。これらを生物の組織から温和な条件で単離した場合、キチンのアセチル基は数%程度脱離しているのに対して、糸状菌由来のキトサンのア

ミノ基は約 10%アセチル化されている。したがって、自然界に存在するキチン、キトサンの構造は前記の定義ほど明瞭でない。大体、N-アセチルグルコサミンから構成される多糖で希酢酸に不溶なものをキチン、構成する糖が大部分グルコサミンで希酢酸に可溶な多糖をキトサンと称して区別している場合が多い。キチン、キトサンの分子量はそれらの由来および調製法によって大きく異なるが、通常、 $10^5$ - $10^6$  程度で、1 分子は数千個のグルコサミン残基から構成されている (Figure 1-5)。

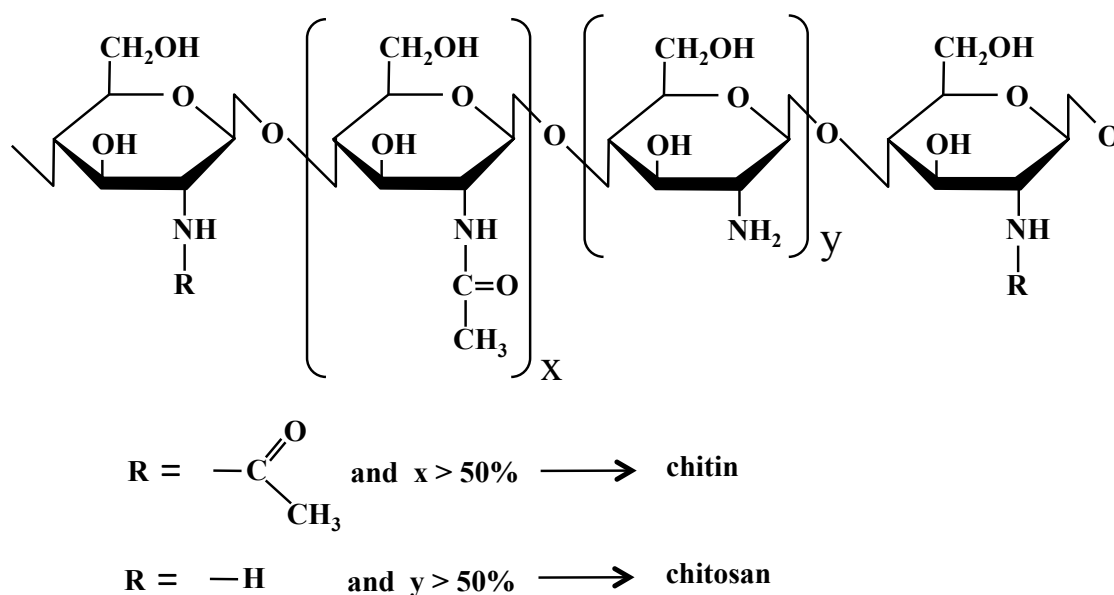


Figure 1-5 The chemical structures of chitin and chitosan.

地球上におけるキチンの年間の生合成量は  $1 \times 10^9$  トンとも、セルロースに匹敵する  $1 \times 10^{11}$  トンとも推定されている。Allan らはそのなかで潜在的に入手可能なキチン量を試算した。これによると、地球規模で毎年、15 万トンのキチンが利用可能である。1990 年度の日本のキチンの使用量は約 920 トンで、全世界の使用量も数千トン以内と考えられるので、利用率は数%にすぎない。

セルロースが木材、紙、繊維として多方面に大量に使用され、人類の文化の向上に大きく寄与してきたのに比べ、キチン、キトサンはこれまでほとんど利用されなかった。その理由として、キチンを含む生物が小型で収集に手間がかかり、共存する無機塩、タンパク質を除去するために多くのコストが必要となることがあげられる。しかし、近年、キチン、キトサンにセルロースにはない性質がいくつか発見されたことから、医療、化粧品、食品、農業分野で次々に

キチン、キトサンを含む新商品が市場に出まわるようになってきた。これに伴ってキチンの生産量も増加傾向にある。地球に残された最後のバイオ資源としてのキチン、キトサンの有効活用が切に望まれる。

最後のバイオマスとして注目されているキチン、キトサンは、学際的にも応用面においても大変幅広い分野で活発に研究や開発がなされている。その応用分野のひとつに、物質分離の機能素材としての有用性を指摘することができる。分離操作に用いられる分離素材は、その目的に応じて最適化されねばならない。本論文第二部で述べるように化学的物理的修飾の可能性に富む分子構造を有することから、キチン・キトサンは物質分離の機能を有する素材として大いに期待することができる。

### 1.3 構造多糖類を膜素材として利用した応用研究と機能探求

生物の機能によって生産される物質の中には、一般の化学反応では合成あるいは分解が困難なものも多い。また人間や他の生物に対する生理的な機能も極めて多彩である。貴重な物質を分離・精製し、工業的に製品化し、食品・医薬品・化粧品などの分野で利用するための留意点としては以下のようなことが挙げられる。

① 目的成分は多成分系の中に存在し、多くの共存成分がある

バイオプロセスは水溶液系で反応が行われることが多く、培養に必要な栄養塩や緩衝溶液の電解質が共存成分として避けられないことが多い

② 目的成分の濃度は一般に極めて希薄である

目的成分は大量の溶媒に希釈されているため、一般に濃度は希薄である。細胞内に蓄積している場合や細胞外に分泌される場合も希薄濃度であることが多く、細胞を破碎して外部に取り出す際にはさらに希薄になってしまうことが多い。

③ 製品には高い純度が求められていることが多い

製品の利用分野にもよるが、特に医薬品として利用する場合には安全基準を厳格に満たす必要があるため、選択的かつ高濃度に濃縮する必要がある。

④ 分離操作が多岐にわたり、何段階にも分かれている

目的成分は多成分系の中で希薄に存在することが多いので、共存成分の中身を知り、成分をグループ化して分離し、不可逆的変性を生じさせることなく、徐々に目的成分の濃度を高めていく体系的な戦略が必要である。

このように、最終的な製品を得るためには分離精製技術が極めて重要であり、

製品コストに占める割合は 80%以上に達している。すでに各種の原理に基づく分離技術が開発されているが、相変化が伴わないためエネルギーコストが低く、溶媒等の残留毒性の懸念もないため、膜の利用が注目されている。

膜を利用した物質分離の技術は、食品や医薬品分野を例とすれば、まず、濾過の概念として、菌体分離、微粒子、ウイルス除去に利用され、次いで、分子サイズの認識を含めた膜分離の概念として、注目成分の分子分画、溶媒と溶質の精密分離に分けて考えることができる。

膜処理の特徴は熱を加えずに溶液の濃縮ができることを第一の特徴としており、次いで、溶質の大きさに応じて分離することが特徴である。この一連の操作によって、濃縮と精製が同時にできる。この特徴から、膜分離法は熱的に不安定な物質の濃縮や高分子物質からの低分子除去などに適した方法と言える。また、水などの溶媒の相変化を伴わずに濃縮ができるため、潜熱エネルギーを分離エネルギーとして考慮する必要がないため、コストの低いプロセスである。

膜分離技術を使用する場合、一般的にタンジェンシャルフロー濾過 (TFF、またはクロスフロー濾過)が使用される。それに対して通常のカートリッジフィルターによる濾過はデッドエンド濾過と呼ばれる。両者の違いを Figure 1-6 に示す。デッドエンド濾過は、膜によって阻止された粒子は膜面に積み重なって行く。そのため阻止された粒子を完全に回収することは困難である。TFF では膜で阻止された物質は原液側全体に分散され、膜面だけに蓄積されることはないので、阻止された物質を溶液状態で回収できる。反面、液に常に流動性がなければならぬため、膜面上に注目成分を固体として回収することはできない。TFF による膜分離は、MF (精密濾過)、UF (限外濾過)、RO (逆浸透濾過) の 3 種類がある。最近では RO 膜のうちに近い範囲 (食塩の阻止率が 50%前後) の分離膜を NF 膜 (ナノフィルトレーション) と呼んでいる。

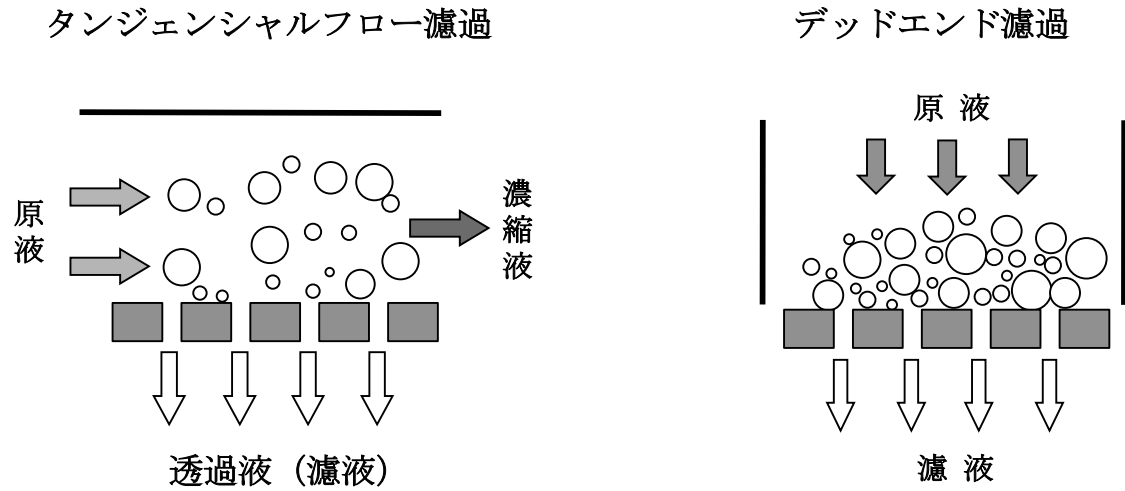


Figure 1-6 Schematic diagram of tangential flow filtration and dead-end filtration.

Figure 1-7 に粒子の大きさと膜分離の種類を示す。この Figure の左側には膜分離の名称であり、概略の範囲と該当する粒子の直径を示す。右側に膜の種類をその透過細孔径に従って並べてある。

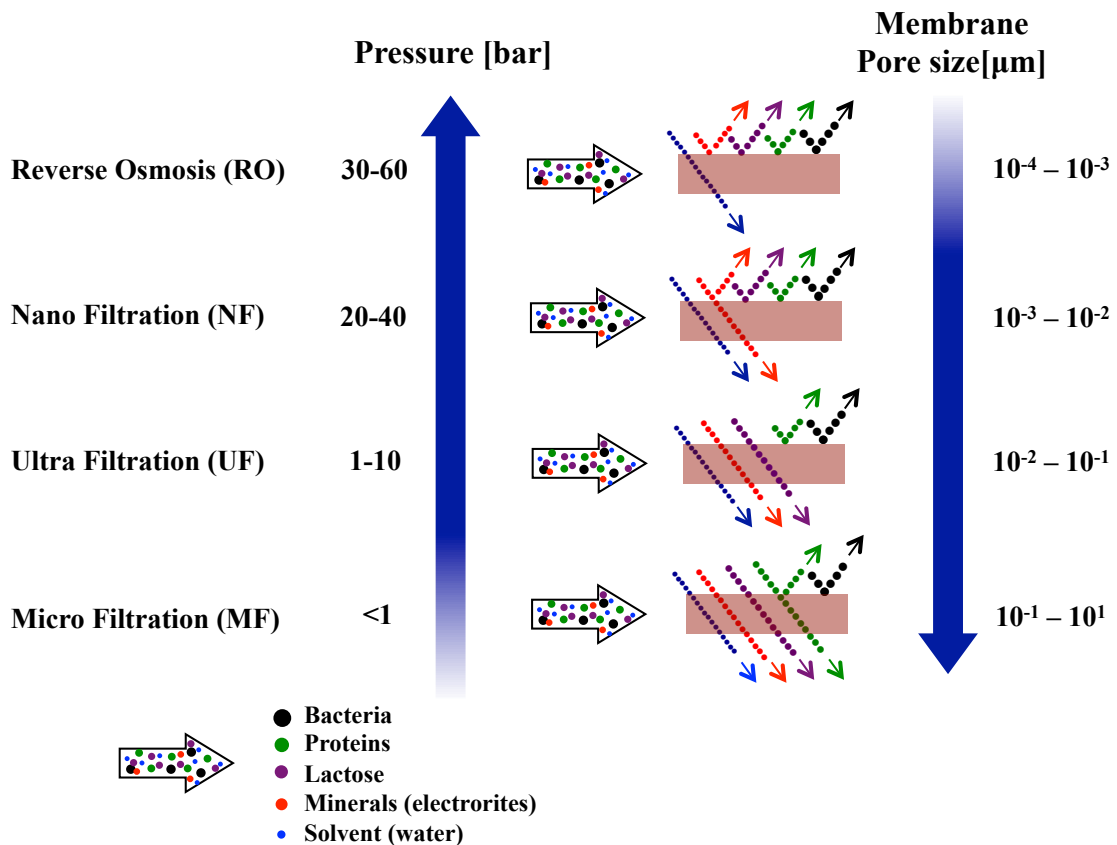


Figure 1-7 Principles of membrane filtration.

また、それぞれの特徴、用途などを Table 1-1 にまとめて示す。表中の膜上の阻止物質とは膜によって阻止されて膜の 1 次側に残る物質である。膜透過物質は膜を透過して 2 次側に出てゆく物質である。プロセスによっては膜で必要な物質を阻止して膜の 1 次側で濃縮する場合と、必要な物質を膜の 2 次側へ透過させて粒子や高分子除去等の精製を行う場合がある。例えばバクテリアなどでタンパクを製造する場合、はじめに培養液から菌体を除去分離するのに MF を使用して膜の 2 次側に必要なタンパク質を透過させ、その次に UF によってタンパクを膜の 1 次側に濃縮し、2 次側に低分子を透過させて精製を行う。抗生物質などの精製の場合には UF 膜を使用して抗生物質を 2 次側に透過させてタンパクやパイロジェン等の高分子を除く。このようにそれぞれの応用分野や目的物質に応じて膜の利用方法がを選択し、最適なシステムを構築するための学術基盤を体系的にまとめることが重要である。

Table 1-1 工業的に使用される膜プロセス

プロセス	膜	駆動力	物質分離の機構	適応分野
マイクロ濾過 (MF)	対称微細孔高分子膜 孔径0.03 ~ 10 $\mu$ m	圧力 1 ~ 5kgf/cm <sup>2</sup>	孔径と粒子径による ふるい分け	除菌、清澄、細胞・バクテリア の捕集と濃縮、ウイルスの分離
限外濾過 (UF)	非対称構造をもつ多孔膜 孔径10 ~ 200Å (MW1000~100万)	圧力 2 ~ 10kgf/cm <sup>2</sup>	孔径と粒子径および 溶質分子の大きさによる ふるい分け	タンパク質、酵素、ポリペプチド ワクチン等の高分子溶液の分離 濃縮・精製
逆浸透 (RO)	異方性膜 (スキン層と多孔性支持体)	10 ~ 100kg/cm <sup>2</sup>	均一な高分子マトリックス 中への溶解-拡散	塩、糖、アミノ酸の濃縮、水の分 離
拡散透析 (D)	強塩基性イオン交換膜	濃度差	膜中への溶解-拡散	無機酸と塩類、低分子と高分子 の分離、酸、アルカリ回収、発酵 液からの塩、酸、塩基の分離、 アミノ酸の分解、電解質の濃縮
電気透析 (ED)	PVA系中性膜陽・陰イオン 交換膜	電位差	粒子の荷電	
ガス分離	シリコン系、ポリイミド非対称膜	数10 ~ 150kg/cm <sup>2</sup>	膜中への溶解-拡散	酸素と窒素の分離、水素の分離、 メタンと炭酸ガスの分離
膜蒸留 (MD)	対称または非対称の疎水性 多孔膜	濃度差による蒸気 圧差	蒸気分圧	アセトン、エタノールなどの揮発性 有機溶媒の分離
浸透気化 (PV)	非対称膜 (スキン層と多孔性支持体)	分圧 0.001 ~ 1kgf/cm <sup>2</sup>	高分子マトリックス中へ の溶解-拡散	水溶液からエタノール、ブタノール 酢酸の分離、共沸混合物の分離
液 膜 (L)	対称または非対称多孔膜に 保持された液体	化学ポテンシャル	キャリアー輸送	塩、生理活性物質の選択分離

膜の選択的透過性は多孔性膜の場合は孔径と分子径との相互作用によって生じる。また、非多孔性膜を用いる場合では、分子の膜材料への溶解度あるいは膜内での拡散係数の差によって物質を分離することが可能になる。

多糖は第 3 の生体高分子といわれ、核酸やタンパク質に並ぶ重要な天然高分



子である。比較的安価で、かつ安定なものが多いため、分離膜の素材としては極めて有望と考えられるが、その積極的な利用は限られているのが現状である。多糖類は地球上に最も多く存在する有機化合物群であり、エネルギー問題や環境問題を考えても、その有効利用法の開発は重要な課題であると言える。

例として、アルギン酸を膜素材とした研究では、分子選択性膜としてグルコン酸ブロックの存在割合は糖鎖ネットワークの形成に重要な役割を果たすとして注目され、60Da ~ 826Da という極めて小さい分子量変域において、鋭敏な分子サイズ認識能を有している(Kashima et al. 2011)。また、多応答性でコントロールされた薬剤送達の為の多糖類アルギン酸膜に関する研究が報告された。バイオミネラリゼーションされた多糖類成分はカプセル化された薬剤の透過を防止し、薬剤放出を効果的に抑制出来ることを示した。得られた膜は持続的な使用が可能な多応答性薬剤送達の"スマート"多糖類材料として使用出来る(Shi et al., 2010)。

また、セルロースナノ多孔質膜を通したイオン輸送と拡散輸送の研究においては、塩化ナトリウム溶液の輸送における電荷および細孔閉じ込めの効果に関する研究が報告された。イオン輸送数、拡散係数および有効膜固定電荷濃度を膜電位値分析によって決定し、一方、広範囲の供給 NaCl 溶液(0.005M~0.4M)での拡散実験から電解質拡散係数を得た(Romero et al., 2013)。

そして、アガロース膜による水と有機物混合溶液のパーバレーション分離に関する研究が報告された。膜素材にグリーンポリマーのアガロースを用いて水とメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールと酢酸の各混合溶液のパーバレーション(PV)分離実験を行った結果、アガロース膜は混合溶液から水を優先的に透過した。透過温度 30°C の濃度 0 での水蒸気拡散係数は、 $1.17 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$  であった。アガロース膜は水混和有機物脱水用の有望な膜の 1 つである(Yoshikawa et al., 2002)。

後に詳述するように chitosan や複合した  $\kappa$ -carrageenan/pullulan を膜素材として用いた膜分離の検討も行われている。このように、再生可能で豊富に存在する資源である多糖類を石油由来のポリマーの代替資源としていかに利用するかは、エネルギー問題や環境問題の両面から重要な課題である。

#### 1.4 本研究の目的

Chitosan 膜においては、表面改質によって単一膜の有効膜面積増大と膜内部の

空隙の非対称構造の形成とともに、大きな分子群を確実に捕獲するため、リガンドを導入し、分離操作の上流側 (Up Stream) を担当する分離膜としての可能性 (第一部 (第 2、3、4 章))。また、 $\kappa$ -carrageenan と pullulan の複合膜においては、糖鎖ネットワークの指標として  $\kappa$ -carrageenan 存在割合に注目し、精密な分子サイズの認識能力によって分離操作の下流側 (Down Stream) を担当する分離膜としての可能性 (第二部 (第 5、6、7、8 章)) に関する検討を行っている。一連の研究成果により、食品由来の生体高分子の複合化と化学修飾により、糖鎖ネットワークの制御を実現し、注目成分の特性に応じて分離操作の上流側と下流側をそれぞれ担当する高分子膜を新規に調製し、分離操作の多段的且つ連続的なプロセスを提案することである。

## 1.5 本論文の構成

以下に本論文の各章の内容を記す。体系図を Figure 1-8 に示す。

第 1 章では本研究で注目する chitosan、 $\kappa$ -carrageenan と pullulan の起源や化学組成について記述し、その糖鎖ネットワークの制御因子ならびに複合化の重要性について述べた。また、本研究の中心となす膜分離技術の特徴並びに生体高分子膜の応用例に触れるとともに、本研究の目的を述べる。

第 2 章では、Chitosan は単独で製膜性の良さを有しているため、本章では Silica 微粒子による鋳型による表面改質を行い、膜表面に微細な凹凸構造と膜の内部に空隙の非対称の分布を形成することによって、膜一枚の実質表面積の拡張と非対称化を試みた。Silica 微粒子により膜調製時に処理された chitosan 膜はより高い純水透過性能を示し、透過面積の増大と非対称構造の形成により水の透過流束が増大する。溶媒の高速透過を目指すために、分離操作の上流側(Up Stream)を担当する膜の可能性を述べる。

第 3 章では、濃度勾配を推進力とした自由拡散に基づく物質透過特性の測定により、chitosan 膜が大きい分子量タンパク質 (Lysozyme (14kDa), Trypsin (20kDa), Pepsin (34kDa), Egg Albumin (43kDa), BSA (65kDa)) に対する分離特性を解明した。本研究において、分離操作の上流側 (Up Stream) を担当する分離膜としての可能性を示す。また、圧力を推進力とした溶媒(水)並びに溶質(タンパク質)の阻止率を詳細に検討することにより、Pepsin (34kDa)、Egg Albumin (43kDa) のタンパク質に対し、阻止率がほぼ 90%に達した。大きな分子群としてタンパク質がリ

ガンドによって膜面に捕獲されたことによって、溶媒の高流束のもと、膜の糖鎖ネットワークによって小さな分子群の分画が制御できる可能性を示す。

第4章では、Cibacron Blue のトリアジン環にあるクロロ基と chitosan のアミノ基との求核置換反応によって共有結合し、リガンドを有する chitosan 膜を調製した。Cibacron Blue F3GA をタンパク質選択性のリガンドとし、タンパク質の分子群を選択的に膜面に吸着させつつ、溶媒を高速で透過させる可能性を示す。

第5章では、製膜はキャスト法を基本手法とし、架橋剤の選択と添加方法に特に留意（濃度・添加のタイミング）を払って、糖鎖ネットワークの制御を確立した。最初に、グルタルアルデヒドによる架橋された高分子溶液をガラスの平滑面上に流涎して加温乾燥により乾燥膜を成形する。また、複合化の一方の成分である  $\kappa$ -carrageenan の二重螺旋分子構造はカリウムイオンにより pullulan と架橋することができる。これより複合膜は実用に耐えられる機械的強度を得た。本研究の手法によって湿潤状態でも安定な平滑面を有する  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合自立膜の再現性の高い調製法を確立する。

第6章では、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜を用い、Urea (60Da)、Glucose (180Da)、Methyl Orange (327Da)、Indigo Carmine (466Da)、Bordeaux S (604Da)、Brilliant Blue (826Da)、Rose Bengal (1017Da)を指標分子として選考した。各成分単独系の透過流束に基づいて膜内の有効拡散係数を求める。実験結果より、分子量が60~1017Daの変域において膜内の有効拡散係数が15,000倍変化することを示す。

$\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜が極めて鋭敏な分子分画性能を有することを、この分野で初めて明らかにした。分子量 327Da 付近で有効拡散係数の変化が最も著しいことから、膜内の透過経路は当該分子サイズ(約 11Å)に集中して揃っていることが示唆された。分子量の変域には精密な分子サイズの認識能力によって分離操作の下流側 (Down Stream) を担当する分離膜としての可能性を示す

第7章では、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の透過特性と糖鎖ネットワークを制御する因子の解析を行った。まず、水分子の透過性能の評価として  $\kappa$ -carrageenan の質量割合  $F_c$  の増大に従って膜の含水率が増大した。 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の純水の透過流束は操作圧力に一次比例して増大したことから、水は高分子膜内の透過経路を層流条件で流れる Hagen-Poiseuille 流れとしてモデル的に捉えられることができる。

第8章では、分子量としての変域 327Da から 1017Da までを対象とし、 $F_c$ 0.33 と  $F_c$ 0.66 二種類の膜を用いて色素成分の分子サイズに基づく分離性能について

評価した。膜によって溶質分子の透過が阻止される割合（阻止率）は溶質の分子サイズによって変化する。分子分画が最も鋭敏に現れる分画分子量は  $\kappa$ -carrageenan の質量比  $F_C$  が 0.33 の複合膜では 327Da、 $F_C$  が 0.66 の複合膜では 466Da であり、 $F_C$  を制御因子として、複合膜の分子分画性能を設計できることが明らかとなった。なお、分子量 500Da 以上の分子の阻止率は 96~98% で実質的に分子の透過は生じない。

第 9 章では、多段膜分離プロセスにおいて、上流側 (Up Stream) には、Silica 微粒子による鋳型による chitosan 膜表面改質を行い、高流束の実現を図るとともに、Cibacron Blue F3GA をリガンドとし、大きな分子群（タンパク質等）を選択的に膜面に捕獲するタンパク質群分離分離膜としての利用が期待できる。下流側 (Down Stream) には、 $\kappa$ -carrageenan と pullulan を複合させ、調製した複合膜は分子サイズ(60~1017Da)を鋭敏に認識し、物質分離膜として可能性が認められるとともに、精密分離膜として利用が期待できる。注目成分の特性に応じて分離操作の上流側と下流側をそれぞれ担当する高分子膜を新規に調製し、分離操作の多段的かつ連続的なプロセスを提案する。

第 10 章では、本研究全体を総括し、オリジナリティー並びに価値を総合的に考察を行い、膜分離プロセスに適用可能性について議論するとともに、今後の課題についても述べる。

## 第一部 食品由来の生体高分子の可能性とその機能化

### 第1章 食品由来の構造多糖類資源の活用と機能探求

- 起源の異なる構造多糖類とその化学組成
- 糖鎖ネットワークを利用した応用開発に関する研究

## 第二部 生体高分子のネットワークの制御と化学修飾によるタンパク質の高速分離膜の開発

### 第2章 Chitosan膜の表面改質と高流速の実現

- Silica微粒子による膜表面改質
- 純水透過特性の改善
- 膜表面の構造解析(SEM)

### 第3章 表面改質chitosan膜による溶媒並びにタンパク質の透過性能評価

- タンパク質の透過特性の評価
- タンパク質の阻止率の評価

### 第4章 リガンドの導入による大きな分子群(タンパク質)の捕獲

- リガンドの導入
- 大きな分離群(タンパク質)の吸着特性

## 第三部 生体高分子の複合化による分子サイズ認識機能膜の開発

### 第5章 κ-carrageenan/pullulan複合膜の調製

- 架橋手法の検討
- 機械的強度とSEM解析

### 第6章 濃度差を推進力とした分子サイズ認識機能の評価

- 鋭敏な分子サイズ認識能力の発見
- κ-carrageenan存在割合による制御

### 圧力差を推進力とした第7章:純水透過性能第8章:指標成分の分離特性

- 純水透過特性
- 指標成分に対する分離特性

## 第四部 総括

### 第9章 本研究の総括とオリジナリティー並びに展望

- 本研究の要旨
- オリジナリティー並びに価値
- 本研究の課題と今後の展望

Figure 1-8 本研究の体系図

## 第二部 生体高分子のネットワークの制御と化学修飾によるタンパク質の高速分離膜の開発

### 第2章 表面改質を施した chitosan 膜の開発と高流束の実現

#### 2.1 本章の背景及び目的

膜分離においては、透過流束と分子選択性は重要なファクターである。膜分離プロセスの実用化においては、この両ファクターを同時に向上させることが必要である。前述のように、膜を通しての物質の透過速度や膜による物質の分離能は、物質が移動する通路となる透過チャンネルのサイズと移動物質のサイズとの関係（物理的因子）や、高分子ネットワークを構成する膜の素材と分子との親和性、静電化学の相互作用（物理化学的因子）などが相互に関係する。また、透過速度は膜の有効面積に比例し、膜厚さに反比例するので、溶液流涎法で製膜された高分子膜では表面の緻密活性層の実質面積を増やし、且つ膜厚さを薄くできれば、物質の排除性を低下することなく、透過性の向上が期待できる。

一般的に透過流束を向上させるために、中空糸膜の場合、多数本の中空糸を束ねるモジュール化と中空糸長を長くして膜面積を増やすこと、また、平膜を用いる場合は一枚の膜をスパイラル方式で巻いた状態で用いたり、複数枚の膜を使うことなどの工夫することによって膜面積を増やす必要がある。

Silica 微粒子は酸性条件では加水分解を受けにくく、強塩基性条件下において、silica 微粒子自身が溶け出す。且つ、chitosan は天然多糖類でありながら、膜として存在する状態において高温、強塩基性条件にも安定である。本研究の目的は chitosan 膜の透過性能を向上させるために、製膜プロセスにおいて、silica 微粒子を鑄型として膜表面に存在させ、高温且つ強塩基性条件下で silica 微粒子の溶け出した跡に微細な凹凸構造の形成を試みることにより、一枚の膜の膜表面積を実質的に増大させ、透過流束の増大を図ることである。

#### 2.2 実験系および解析法

##### 2.2.1 供試された chitosan の内容

本論文では、Sigma-Aldrich 社から購入した以下の3種類の chitosan を実験に用いた。

Chitosan, low molecular weigh (Sigma-Aldrich)

Chitosan, medium molecular weigh (Sigma-Aldrich)

Chitosan, high molecular weigh (Sigma-Aldrich)

上記の試薬は、基本的に分子量が主として異なるグレードである。購入元 Sigma-Aldrich ([www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)) の品質管理規格として、1wt%酢酸水溶液中に chitosan 濃度 1wt%における粘度を用いており、Table 2-1 に Guarantee Viscosity [cP]として記載した。Chitosan は、規格上で DD75%以上としている。

Table 2-1 Guaranteed product quality standards of chitosan from Sigma-Aldrich.

Product Description	Deacetylation Degree [%]	Viscosity [cPs]
Chitosan, low molecular weight	75 - 85	20 - 200
Chitosan, medium molecular weight	75 - 85	200 - 800
Chitosan, high molecular weight	> 75	800 - 2000

市販の chitosan は、製品に微量なタンパク質が存在する可能性が高いため、本論文では、第 2 章及び第 3 章において、リガンドの導入によるタンパク質の吸着並びに分離に関する研究を行った。研究結果の信頼性を高めるために、実験に用いる chitosan は製品からさらに 40wt%程度の高濃度・高温度（80℃）の塩基性水溶液にて処理することによって DD90%以上のものを使用している。

#### 高分子溶液の粘度と濃度、並びに固有粘度と分子量の関係

一般に、高分子溶液の粘度  $\eta$  と濃度  $c$  の関係は、 $\eta_0$  を溶媒粘度、A、B、C は係数としたべき乗展開した式 (2-1) で示し、高分子物性の解析に用いられる。

$$\eta = \eta_0(1 + Ac + Bc^2 + Cc^3 + \dots) \quad (2-1)$$

ここで、比粘度 (specific viscosity)  $\eta_{sp}$  を式 (2-2) のように定義する。これは溶質 (高分子) の存在による粘度の増分である。また、 $\eta/\eta_0$  を相対粘度 (relative viscosity) とし、 $\eta_{rel}$  で表す。

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (2-2)$$

式 (2-1) に式 (2-2) を代入することにより式 (2-3) を得る。式 (2-3) の左辺は濃度単位量あたりの粘度の増分である。

$$\eta_{sp} / c = A + Bc + Cc^2 \quad (2-3)$$

この際、式 (2-3) の第 1 項 A は濃度に依存しない粘度の増分と理解することができるので、固有粘度 (intrinsic viscosity) と呼ばれ、 $[\eta]$  で表す。

多くの高分子溶液では、式 (2-3) の係数 B について、 $B=k'[\eta]^2$  の関係がある。また、比較的低濃度域では、式 (2-3) の高次の濃度項を省略することができるので、式 (2-4) が得られる。

$$\eta_{sp} / c = [\eta] + k'[\eta]^2 c \quad (2-4)$$

これをハギンス (Huggins) の式という。k' は Huggins の定数といい、高分子の種類、溶媒の種類、並びに温度が一定であれば、ほぼ一定の値である。

従って、種々の濃度における溶液粘度を測定し、 $\eta_{rel}/c$  を縦軸、c を横軸にグラフを作成すると一次相関が得られ、濃度 0 への補外によって縦軸の切片より  $[\eta]$  が得られ、勾配より k' が求められる。

$\eta_{rel}/c$  と c 一次の相関が得られない場合は、 $(\ln \eta_{rel})/c$  を縦軸、c を横軸にグラフを作成すると一次相関が得られることがあり、 $c \rightarrow 0$  の縦軸の補外値より  $[\eta]$  が求められる。この場合は式 (2-4) の代わりにミード-ファース (Mead-Fuoss) の式、

$$(\ln \eta_{sp}) / c = [\eta] - \beta [\eta]^2 c \quad (2-5)$$

を用いる。ここでは  $\beta$  は定数で、

$$\beta + k' = 0.5 \quad (2-6)$$

の関係がある。Huggins の式、Mead-Fuoss の式とも一次相関が得られない場合は式 (2-4)、式 (2-5) を併用し、また式 (2-6) を考慮すれば、 $[\eta]$  の決定は正確に



なる。

なお、高分子溶液では濃度  $c$  の単位として  $[g \cdot dL^{-1}]$  を使用するのが通常であり、 $[\eta]$  の単位は  $[dL \cdot g^{-1}]$  となる。

次に、固有粘度  $[\eta]$  と高分子の分子量  $M$  の間には式 (2-7) の関係が成立する。

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (2-7)$$

これをマーク (Mark) -ホウイंक (Houwink) -桜田の式といい、 $K$  及び  $a$  は高分子の種類、溶媒の種類並びに温度によって決まる定数である。

#### Chitosan の分子量並びに脱アセチル化度の測定

Chitin・Chitosan の分子量 (Molecular weight, MW) と脱アセチル化度 (Deacetylation degree, DD) は、天然高分子である Chitin・Chitosan の特性を決定つける最も重要なパラメータである。

#### Chitosan 分子量の測定

十分に乾燥した chitosan 0.4g を 0.2M 酢酸 - 0.1M 塩化ナトリウム - 4M 尿素水溶液に溶解し 100ml とする (0.4% chitosan 溶液、w/v)。次に、この 0.4% chitosan 溶液を上記の酢酸 - 塩化ナトリウム - 尿素溶液で 2 倍希釈する。希釈を chitosan 濃度が最初の 1/64 となるまで繰り返し 7 種類の溶液を作製し、冷暗所に 10 日間放置して十分平衡に至らしめる。恒温槽の温度を 25°C に設定して各溶液の粘度を測定する。粘度式は、上述の Mark-Houwink-Sakurada の式(2-7)を基本とする。この式 (2-7) で両辺の常用定数をとると

$$\log M = \frac{1}{a}(\log[\eta] - \log K) \quad (2-8)$$

となる。Lee (1974) によって求めた、0.2M 酢酸 - 0.1M 塩化ナトリウム - 4M 尿素溶液中での定数  $K$  と  $a$  はそれぞれ  $8.93 \times 10^4$  と 0.71 である。これらの値を使って分子量を求められる。

### Chitosan の脱アセチル化度の測定

十分に乾燥した chitosan を 0.5g 秤量し、5vol%酢酸(99.7%, Wako)水溶液に溶解し 100g とする。この chitosan 酢酸溶液 1.0g を測り取り、純水 30mL を加え、十分攪拌混合する。指示薬として 0.1wt%トルイジンブルー溶液(コロイド滴定用、Wako)を 3 滴加え、0.0025N ポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)溶液(Factor=1.002、コロイド滴定用)で滴定する。滴定は、再現性と信頼性の為試料毎に 5 回ずつ行い、その平均値を実験値とした。

0.0025N PVS-K 溶液の滴定量を  $v$  [mL]、ファクターを  $f$  [-]とし、式(2-9)より滴定サンプル 1g 中に含まれるグルコサミン残基の質量  $X$  [g]を算出した。また、式(2-10)より、滴定サンプル 1g 中に含まれるアセチルグルコサミン残基の質量  $Y$  [g]を算出した。

$$X [g] = \frac{1}{400} \times \frac{1}{1000} \times f \times 161 \times v \quad (2-9)$$

$$Y [g] = 0.5 \times \frac{1}{100} - X \quad (2-10)$$

得られた  $X$  と  $Y$  を脱アセチル化度の定義式として式(2-11)に代入し、実測値を算出した。

$$DD [\%] = \frac{\frac{X}{161}}{\frac{X}{161} + \frac{Y}{203}} \times 100 \quad (2-11)$$

なお、式(2-5)中の 161 と 203 は、それぞれグルコサミンとアセチルグルコサミンの分子量を示している。すなわち、DD は chitin・chitosan を構成している糖鎖ネットワーク中におけるグルコサミン残基のモル百分率を示している。

Chitosan 膜の DD をコロイド滴定法で測定するには、膜を十分に乾燥する必要がある。したがって、湿潤している chitosan 膜は、その内部に含まれている水分のエタノールおよびアセトン等のアルコールに置換した後、乾燥機で 353K、24 時間乾燥してアセトン並びにアルコールを除去し、粉碎器(MILLSER IFM-77G,

Iwatani, Tokyo)で10分間粉碎したものをコロイド適用材料とした。

### 2.2.2 Silica 微粒子による Chitosan 膜表面の改質

酢酸 (99.7%, Wako)を純水で希釈し、1wt%酢酸水溶液を調製した。Chitosan (Low, Medium or High molecular weigh, Sigma-Aldrich) 1g を 99g の 1wt%酢酸水溶液に添加し、室温にて 12h 時間攪拌し溶解させ、1wt%chitosan-酢酸水溶液を調製した。混合溶液中の不溶物質を除去するため吸引濾過を行った (濾紙 No.1, ADVANTEC, Tokyo)。

混合溶液 100g (chitosan 1g 相当) に対し、柔軟剤とする Glycerol (99%, Wako) 0.3g を添加し、均一になるまで攪拌し、chitosan-glycerol-酢酸水溶液を調製した。所定量の silica 微粒子 (1 ~ 7 $\mu$ m, SUNSIL - 130NP, (株) リンデン) を添加し、均一になるまで攪拌した後、chitosan&silica 微粒子の混合溶液 30g をガラスシャーレ (内径 90mm) に流涎し、silica 微粒子を完全に自然沈降させるため、ディシケーター内にて 24 時間静置した。その後、ガラスシャーレを水平に保ちながら、熱風乾燥機にて重量の変化がなくなるまで乾燥させた (12 時間、333K)。乾燥した chitosan-silica 混合膜に、まず 1.5M の水酸化ナトリウム水溶液を注ぎ、シャーレ内で浸漬させる。塩基的作用により酸性溶液中の chitosan はゲル化する。1 時間程度経過後、膜は自発的にシャーレから離脱した。

次に、silica 微粒子を除去するため、離脱した膜をガラスシャーレから丁寧に取り出し、予め用意した 1.5M の水酸化ナトリウム水溶液に入れ、湯煎(343K)を行った。膜表面に鑄型として存在した silica 微粒子自身が膜から溶け出し、膜表面に微細な凹凸構造を形成した。脱 silica 微粒子処理後の膜は、室温にて膜面に付着した水酸化ナトリウムを純水で複数回洗い流した。最後に、純水に保存し実験に供する。

### 2.2.3 走査型顕微鏡(SEM)による膜表面形態の観察

湿潤している chitosan 膜は、その内部に含まれている水分をエタノールにより置換した後、加熱乾燥 (333K, 12h) によって十分乾燥した。

金属 (Zn) 蒸着処理 (30mA, 30sec) を行ったサンプルを SEM S-3500N, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo)により、加速電圧 5 ~ 10kV の条件で観察を行った。

## 2.2.4 機械的強度の測定

レオメーター (SUNRHEOMETER) を用いて力学的試験を行った。引っ張り試験により破断時の最大せん断応力と伸長割合 (ひずみ) を求める。膜厚さはマイクロメーター (MITUTOYO、KANAGAWA、JAPAN) を用いて測定した。

湿潤させた chitosan 膜を幅 10mm×長 40mm にカットした。レオメーターのクリップに膜の両端を膜の滑り止めのための濾紙とともに 10mm 挟んだ。操作設定は測定間隔 40[count・s<sup>-1</sup>]、測定速度 1[mm・s<sup>-1</sup>]、荷重 5[N]であった。

破断時の最大剪断応力 (stress [MPa]) と伸長率 (strain [-]) は、それぞれ式 (2-12) 式 (2-13) を用いて算出した。

$$\text{Maximum Stress} = \frac{F_{MAX}}{A_C} \quad (2-12)$$

$$\text{Maximum Strain} = \frac{\Delta L}{L_i} \times 100 \quad (2-13)$$

ここに、機械的強度は膜の破断時の最大荷重  $F_{MAX}$ [N] を断面積  $A_C$ [m<sup>2</sup>] で除すことで求めた最大破断応力 [Pa] と、伸長性の評価として、未荷重時の初期膜長さ  $L_i$ [m] に対する破断時の伸長分  $\Delta L$ [m] を 100 倍した最大伸長率 [%] で評価した。

## 2.2.5 純水透過流速の測定

純水透過実験装置の概略図を Figure 2-1 に示す。実験装置は、主に攪拌式限外濾過セル (UHP-62K、ADVANTEC)、窒素ガスポンプ、デジタル圧力計 (PGM-5KH、Kyowa Electronic Instruments Co., Ltd., Tokyo)、電子天秤 (Mettler PJ3600、Zurich) で構成されている。

純水透過実験方法は以下の手順に従って行った。

- (1) 純水透過セルは内容積が約 200mL 程度の耐圧筒を用い、セル中に設置しているマグネチックスターラーの回転子がある膜に触れない程度の高さに取り付けられている。セルの下部には螺旋状の排水案内用の細かい溝がきつてある支持板がある。膜を透過した水は排水案内の溝によって集められ、外に取り出す細いチューブに導かれている。膜の周囲を正しく合わせておき、膜の下と支持板の間には濾紙 (ADVANTEC No.2) を介して、上蓋を

- 載せてセル内の空気が逃げないようにしっかり締める。
- (2) セル内に 190mL の純水を充填し、上蓋をしっかりと締めて、実験を始めるにはまず攪拌子を回転させてから加圧する。加圧はポンペの減圧弁の低圧側の圧力計を見ながら調節用のハンドルを締め込んでゆき、所定の圧力に加圧する。
  - (3) 実験条件は、攪拌速度一定(約  $200\text{s}^{-1}$ )、操作圧力(50~200kPa)、室温( $25\pm 1^\circ\text{C}$ )であった。
  - (4) 透過流速  $J_V$  は式(2-14)により求める。

$$J_V = \frac{V_P}{A \cdot t} \quad (2-14)$$

ここで、 $V_P$  は膜を透過した純水体積[ $\text{m}^3$ ]である。本実験系では、膜を透過した純水の質量を測定し、水の密度から体積に換算して  $J_V$  を求めた。透過セルの内径より、この装置における膜の面積は  $0.0021\text{m}^2$  である。

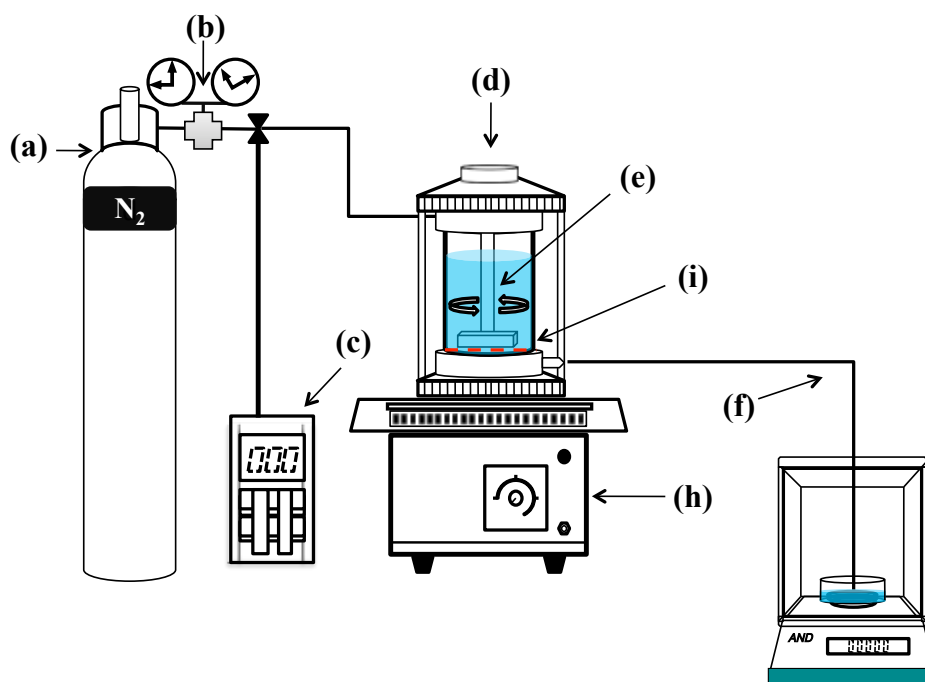


Figure 2-1 Apparatus for water permeation experiment. (a)  $\text{N}_2$  gas, (b) regulation valve, (c) transducer, (d) filtration cell (e) magnetic stirring bar (f) drain pipe, (g) electronic balance, (h) magnetic stirrer, (i) membrane.

## 2.3 実験結果および考察

### 2.3.1 Chitosan の分子量および脱アセチル化度

Chitosan の平均分子量は Figure 2-2 に示した固有粘度 $[\eta]$ と濃度  $c$  との関係から、 $c \rightarrow 0$  に外挿して得られる切片から  $[\eta]_{c \rightarrow 0}$  を用いて式 (2-1) に示した Mark-Houwink-Sakurada 式により算出した。Figure 2-2 における濃度範囲は 0.01 ~ 1 w/v% といった比較的低濃度域で行っており、1w/v% より高濃度では、この分子量測定における前提である希薄溶液に対して溶媒と溶液の密度がほぼ等しいという仮定から外れるため、直線性が悪くなった。Figure 2-2 から得られた固有粘度より算出した chitosan の分子量は Table 2-2 に示すように、Low molecular weight chitosan の分子量は  $3 \times 10^5$ 、Medium molecular weight の分子量は  $1 \times 10^6$ 、High molecular weight の分子量は  $1.4 \times 10^6$  であった。一般的に市販されている chitosan の分子量は、調製方法や由来に依存するが、その分子量は  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$  と言われており、本研究で得られた粘度平均の分子量は妥当なものと考えられる。本研究では、Mead-Fouss の式による相関が良好である。

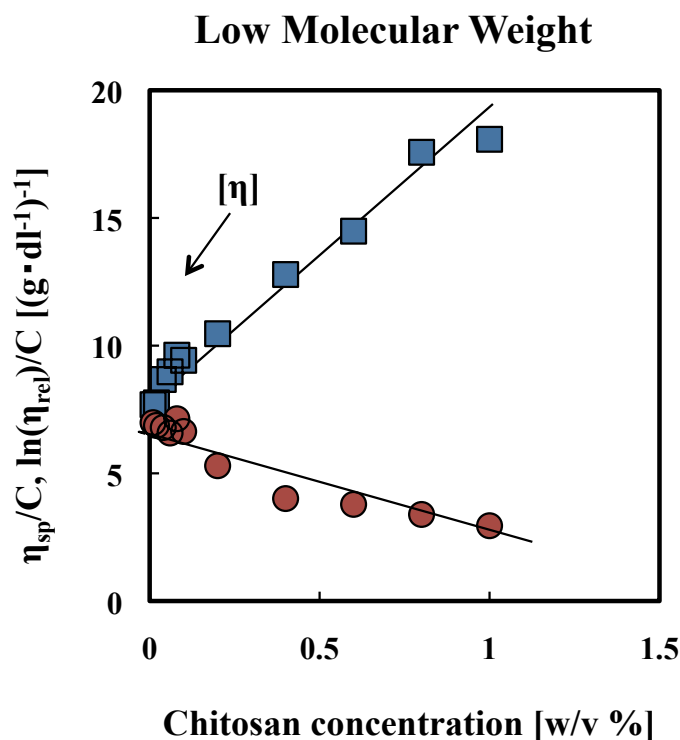
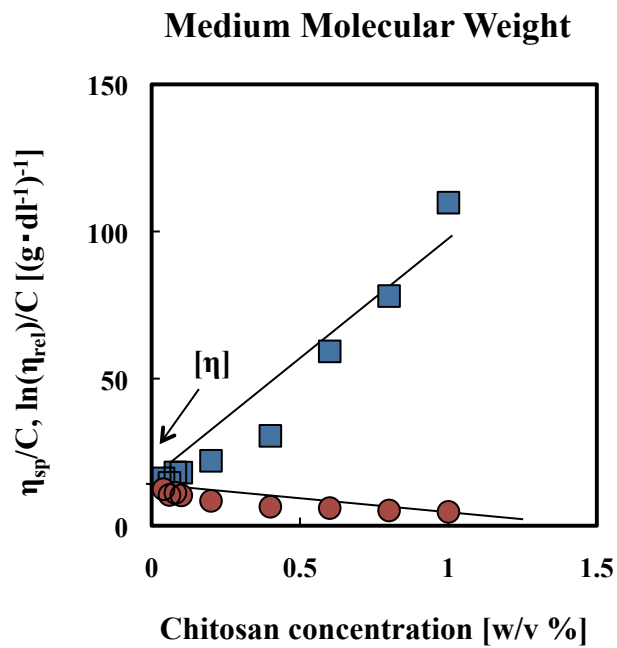


Figure 2-2 (a) Determination of intrinsic viscosity for low molecular weight chitosan.

(■) Expressed by the Huggins equation; (●) Express by the Mead-Fouss equation.

Figure 2-2 (b) Determination of intrinsic viscosity for medium molecular weight



chitosan. (■) Expressed by the Huggins equation; (●) Express by the Mead-Fuoss equation.

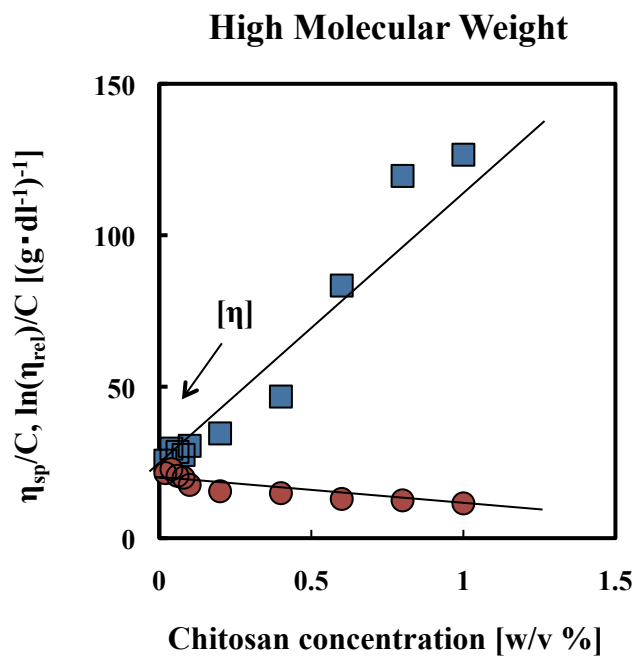


Figure 2-2 (c) Determination of intrinsic viscosity for high molecular weight chitosan. (■) Expressed by the Huggins equation; (●) Express by the Mead-Fuoss equation.

Table 2-2 Measured molecular weight and deacetylation degree.

Chitosan	Intrinsic viscosity	Mean molecular weight [Da]	Deacetylation Degree [%]
	[ $\eta$ ]		
Low MW	7.90	$3 \times 10^5$	92.3%
Medium MW	16.6	$1 \times 10^6$	94.1%
High MW	21.0	$1.4 \times 10^6$	91.5%

### 2.3.2 走査型顕微鏡(SEM)による膜表面形態の観察

2.2.2 の製膜時、silica 微粒子によって表面改質した chitosan 膜と処理しない chitosan 膜の形態を観察するため、両方を比較する光学写真を Figure 2-3 に示した。処理しない chitosan (Figure 2-3(a))は透明であったが、表面改質 chitosan 膜表面に微細な凹凸構造が形成され、太陽光の散乱によって薄白を観察された。

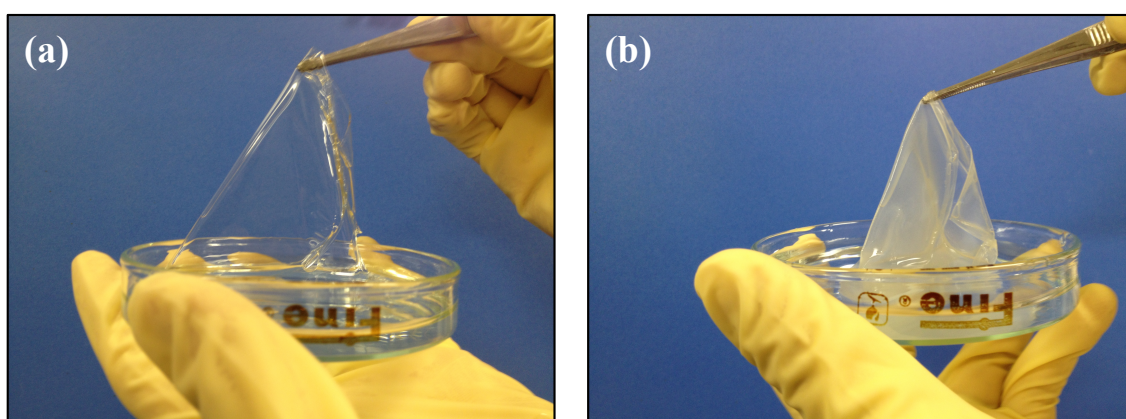


Figure 2-3 Photograph of original chitosan membrane (a), and surface modified chitosan membrane (b).

Figure 2-4 に表面改質した chitosan 膜の SEM 写真を示した。膜表面の SEM 写真より、silica 微粒子で処理した膜表面は微細な凹凸構造を観察された。silica 微粒子のない膜表面は平滑である。製膜時に silica 微粒子は膜表面に鑄型として存在し、その微粒子が溶け出した跡に微細な凹凸構造を形成されている。これによって、実質的に膜表面積の増大が図られたと考えられる。この点は純水の透過流束の増大によって実証してゆく (2.3.4 参照)



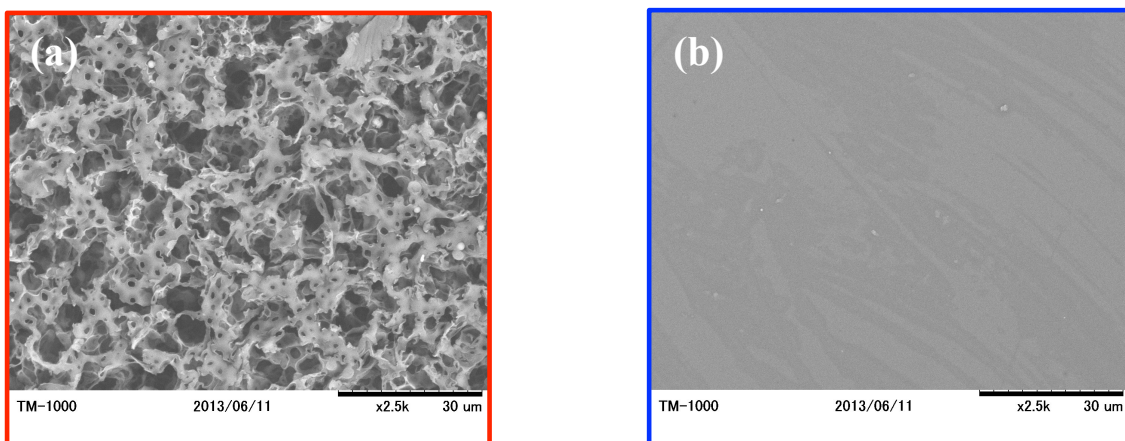


Figure 2-4 SEM image of surface modified chitosan membrane (a) imprinted surface (b) original surface

### 2.3.3 機械的強度の評価

異なる chitosan 分子量と機械的強度の関係を chitosan の破断時の最大剪断応力と最大ひずみに注目して測定した。その結果を Figure 2-5 に示した。分子量の増加に伴い、最大剪断応力と最大伸長率が増加した。分子量が大きくなることによって、高分子鎖がより絡み合った状態になり、弾性が増すとともに、破断時応力が増大し、より強固なネットワークが構築されたことが明らかである。

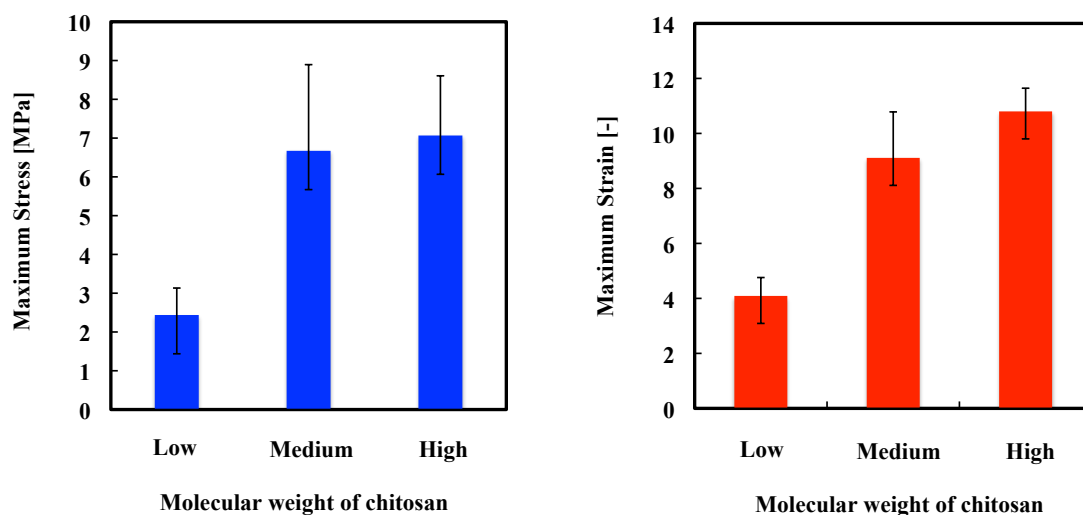


Figure 2-5 Effect of molecular weight on the maximum stress and the strain of prepared chitosan membrane.

Silica 微粒子を用いた chitosan 膜表面処理によって機械的強度の変化を確認するため、機械的強度の測定を Figure 2-6 に示した。silica 微粒子を除去した chitosan 膜とともにオリジナル chitosan 膜を比較のため用いた。表面改質 chitosan 膜はオリジナルと同等の最大切断強度値約 7MPa を示し、silica 微粒子が除去された表面改質膜機械的強度は低下しなかった。これより、Chitosan 膜表面の微細な凹凸構造の形成によって機械的強度を低下させることなく、安定的な強度を保持できたことを証明された。

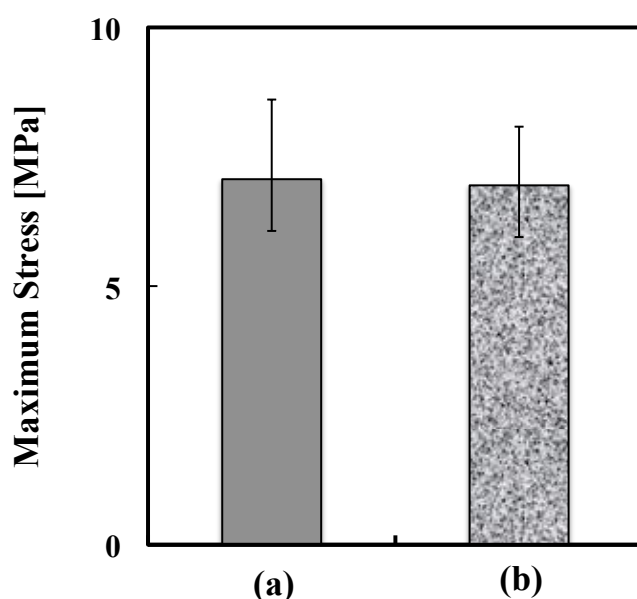


Figure 2-6 The maximum stress of original chitosan membrane (a) and surface modified chitosan membrane (b).

### 2.3.4 純水透過性能並びに高流束の評価

Figure 2-7 に表面改質 chitosan 膜とオリジナル chitosan 膜を用いた純水透過における経時変化を示した。時間の経過に伴い、純水の透過量は時間に一次比例して増加する傾向を示した。純水透過の結果より、Figure 2-7(a)に、silica 微粒子で表面処理された膜は明らかに高い純水透過流束を示した。これは、製膜時に導入した silica 微粒子が膜表面に鑄型とし、その微粒子が溶け出した跡に膜微細な凹凸構造が生じて、実質的に膜一枚当たりの表面積を増加させたと考えられる。また、Figure 2-7(b)には、silica 微粒子の添加量を増大することによって、透過流束がこれに比例して増大した。膜表面の微細な凹凸構造を形成することにより、水との接触面積が実質的に増大させることに成功した。silica 微粒子の粒

子径や導入量を変化させることにより、実質的な膜表面の増大を制御できる可能性がある。

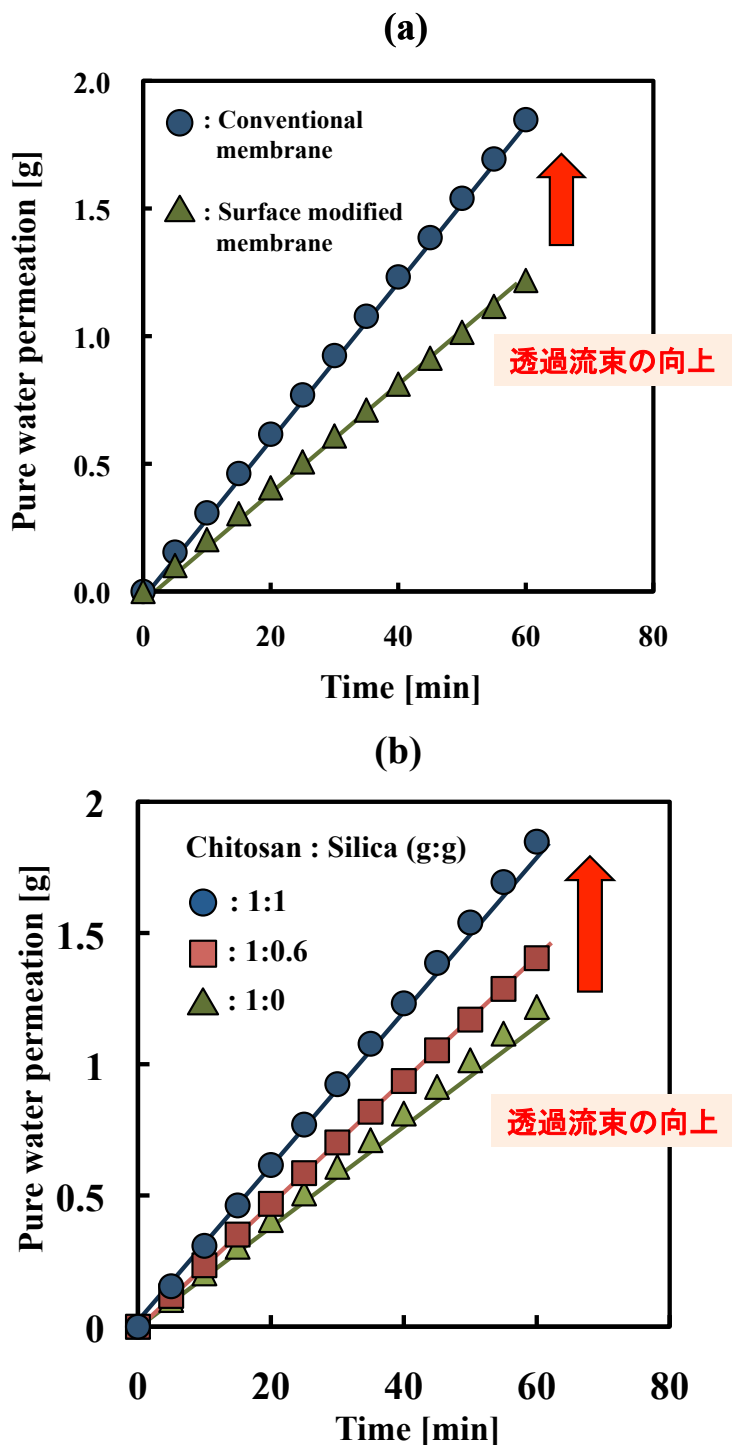


Figure 2-7 (a) Comparisons of pure water permeability; (b) The effect of added silica particles on water permeability of chitosan membrane. (Operational pressure: 100kPa).

純水透過質量の経時変化の勾配を求めることにより、透過流束を算出することが可能である。Figure 2-8 に、表面改質 chitosan 膜とオリジナル chitosan 膜の水透過流束の比較を chitosan の分子量別に示した。Silica 微粒子で表面改質した膜の透過流束はいずれの chitosan 分子量においても約 1.5 倍上昇した。これは、silica 微粒子が製膜時に NaOH 水溶液中に溶解し、膜面に silica 微粒子の鑄型として微細な凸凹が生じ、水との接触面積が実質的に増加したためと考えられる。

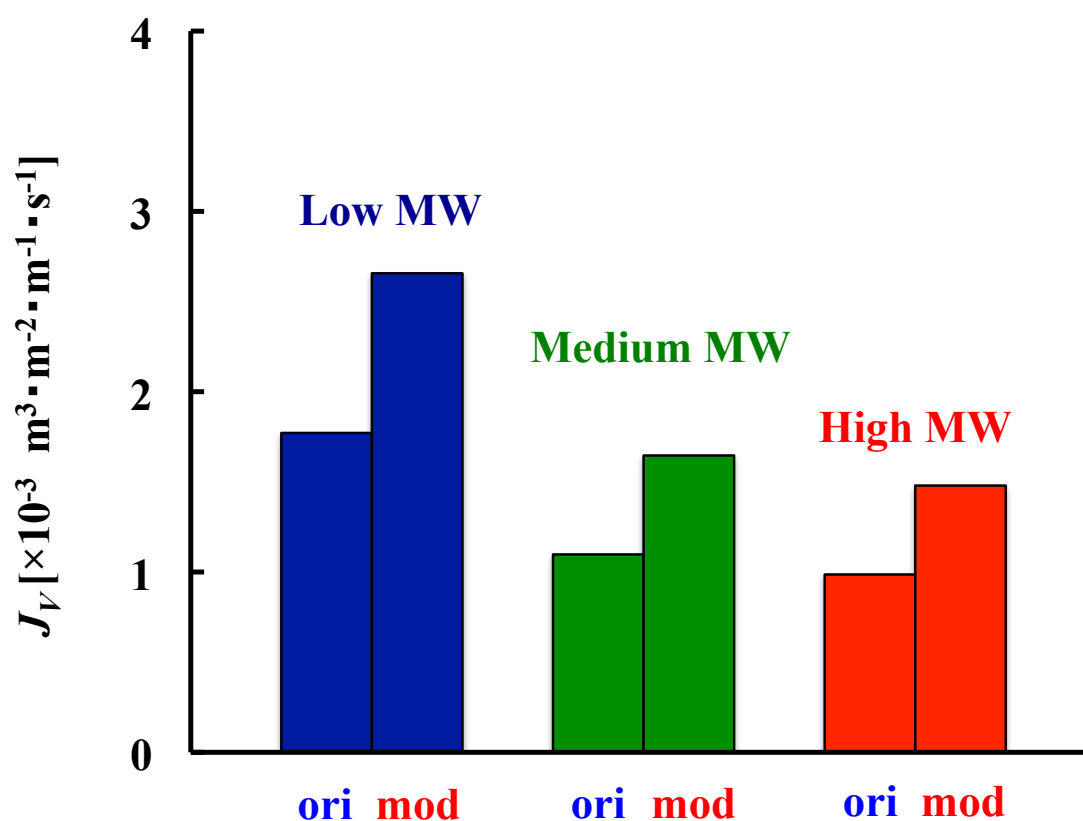


Figure 2-8 Comparisons of original (ori) and surface modified (mod) chitosan membrane on pure water flux (298K, 100kPa)

Silica 微粒子の添加によって表面改質された chitosan 膜は chitosan の分子量に関わらず、すべて純水の透過流束が増大した。透過流束の増大は chitosan の低分子量において、より顕著に現れた。これは低分子量の chitosan では高分子ネットワークの架橋の密度が疎であるため、本来の透過流束が高く、表面改質の効果

が強調されたためと考えることができる。ただし、注意すべき点としてシリカ微粒子の添加量が増大すればれるほど、純水透過流束の透過係数が単調に増大するものではない。本研究の結果では1gのキトサンに対して1gのシリカ微粒子の添加が純水の透過流束の極大値をもたらし、それ以上のsilica微粒子の添加によって純水の透過係数の増大は現れない (Figure 2-9)。これは表面改質の役割を果たすsilica微粒子には最適添加量が存在することを意味する。Silica微粒子の直径を平均3.5 $\mu\text{m}$ 、密度を2g/cm<sup>3</sup>として、直径90mmのガラスシャーレに30gのchitosan/silica微粒子混合溶液 (silica微粒子の含有量 = 0.3g) をキャストした後24時間後、silica微粒子がガラスシャーレの底面に沈降することによって形成したsilica微粒子の積層について試算したところ、約100層という結果が得られた。これによって、製膜時にガラスシャーレの底面に沈降したsilica微粒子は多層的に存在し、塩基処理によってsilica微粒子を除去して残した跡は、chitosan膜の表面だけではなく、膜の内部にも行き渡っていると考えられる (Figure 2-10)。今後は、製膜時の表面単位面積当たりのsilica微粒子の数密度をもとめることによってchitosanの最適添加量をもとめることができると考えられる。

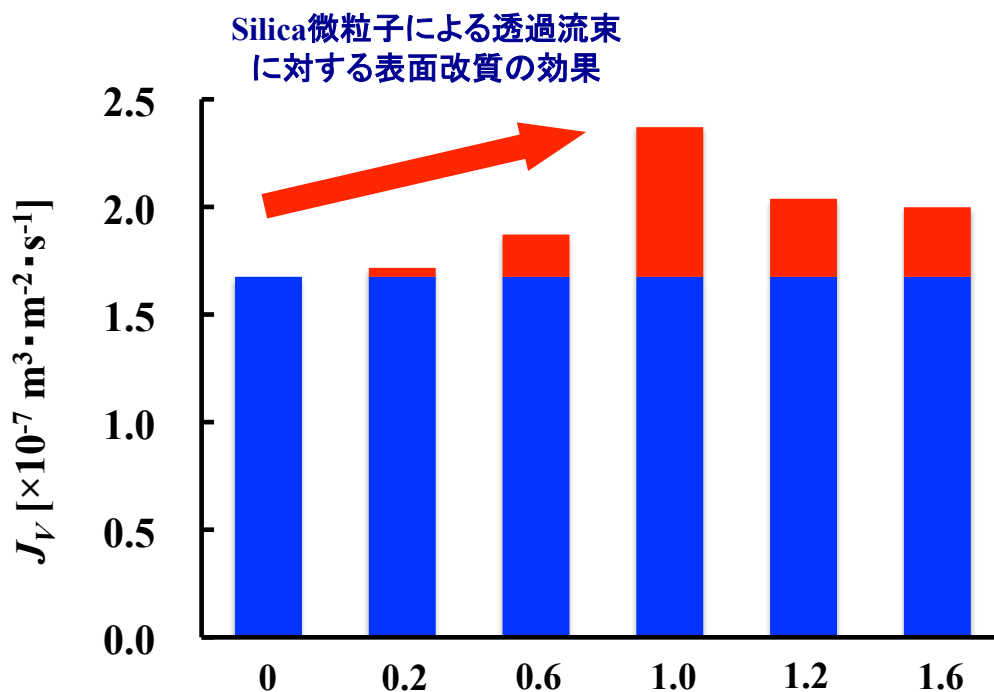


Figure 2-9. The effect of added silica particles on water flux of chitosan membrane (Operational pressure: 100kPa).

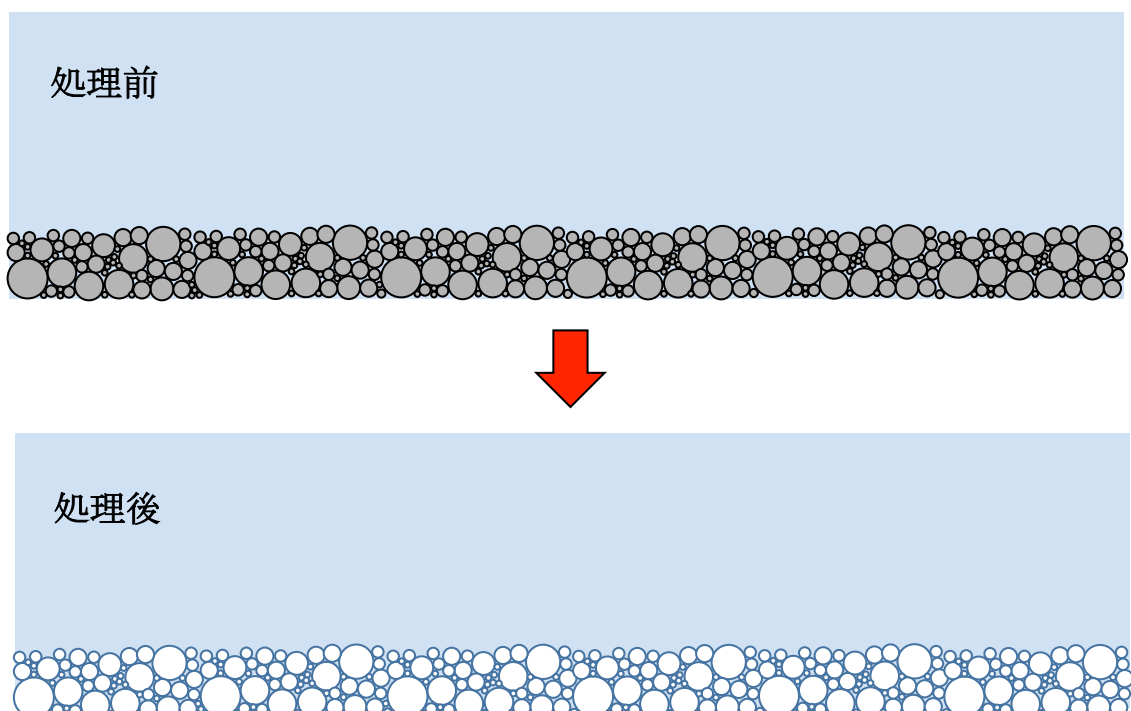


Figure 2-10 積層した silica 微粒子のモデル図。

#### 2.4 本章の結論

本章では、一枚の chitosan 膜の表面積を実質的に増大するための工夫として、微細な凹凸構造を silica 微粒子の鑄型として表面に形成し、膜の高流束の実現を図った。表面改質 chitosan 膜とオリジナル chitosan 膜の水透過流束を比較した。Silica 微粒子で表面改質した膜の透過流束は約 1.4 倍上昇することが確認された。

また、異なる分子量の chitosan 膜の機械的強度測定においては、分子量の高い chitosan 膜ほど最大剪断応力と最大伸長率が最も大きい値を示した。Chitosan 膜表面の微細な凹凸構造の形成によって機械的強度を低下させることなく、安定的な強度を保持できた。

Silica 微粒子を膜調製時に用いることにより表面改質された chitosan 膜は高い純水透過性能を示したことから、本研究の chitosan 膜は高流束の溶媒透過の可能性を有すると期待できる。

## 第3章 表面改質 chitosan 膜による溶媒並びにタンパク質の透過性能評価

### 3.1 本章の背景及び目的

バイオ生産物の分離精製においては、その生理活性を損なうことのない温和な分離法を多段的に組み合わせることが必要である。食品由来の注目成分を生体高分子膜を用いて多段的かつ連続的に分離するプロセスを開発することにあたって、まず、タンパク質のような大きい分子群は膜分離プロセスの上流側にある膜によって捕獲し、下流側にある膜によって糖などの小さい分子群の精密分離を行う戦略的なプロセス構築が必要である。

本章では、膜分離プロセスの上流側を表面改質 chitosan 膜に担当させる。大きい分子量のタンパク質 (Lysozyme (14000Da)、Trypsin (20000Da)、Pepsin (34000Da)、Egg Albumin (43000Da)、Bovine Serum Albumin (BSA, 65000Da)) の膜内の有効拡散係数を実験的に求め、chitosan 膜のネットワークの特性を把握することは、第5章と第6章で記述する  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の分離特性との比較を実施するうえで重要である。

本章の目的は、タンパク質分子の膜内の移動現象を把握することを通じて、上流側を担当する表面改質 chitosan 膜の物質透過特性を明らかにすることである。

### 3.2 実験系および解析法

#### 3.2.1 物質透過実験の設計

Figure 3-1 のように2つのガラスセルで高分子膜を挟み、固定する。膜で仕切られたガラスセルの供給側と透過側に生じた濃度勾配を推進力とする膜内の物質移動を解析する。指標分子の有効拡散係数を求めることによって膜の透過特性を評価する。

膜の物質透過実験は以下の手順で行った。

- (1) 一對のガラスセルに膜を挟み、供給側に指標物質水溶液 (190mL)、透過側に純水(190mL)を入れ、静かにセルホルダーで固定した。液漏れを防止するため、ガラスセルの接続部位をパラフィルムで覆い、完全に密封した。
- (2) 透過セルを恒温水槽 (ISUZU Seisakusho Co., Ltd., Niigata) 内に設置し、スリーワンモーター (HEIDON BL600, BL1200、SHINTO Scientific Co., Ltd., Tokyo) にタービン型攪拌翼 (直径 3[cm]) を接続した。恒温水槽内は 303[K]

の水で満たし、厳密に温度を管理した。

- (3) 境膜物質移動抵抗を無視できる十分な乱流条件で実験を行うため、予備実験の結果に基づき、供給側と透過側の溶液を攪拌速度  $850[\text{m}^{-1}]$  で攪拌しながら、物質透過実験を開始した。所定の時間に双方のセルからサンプリングを行い、定量を行った。なお、実験開始時間 ( $t=0$ ) は最初のサンプリング時とした。
- (4) ガラスセルの円管上部では十分に攪拌の影響を反映されていないことがあるため、サンプリング時にホールピペットの先端を円管上部から  $\frac{3}{4}$  以上挿入してサンプルを採取することに留意した。

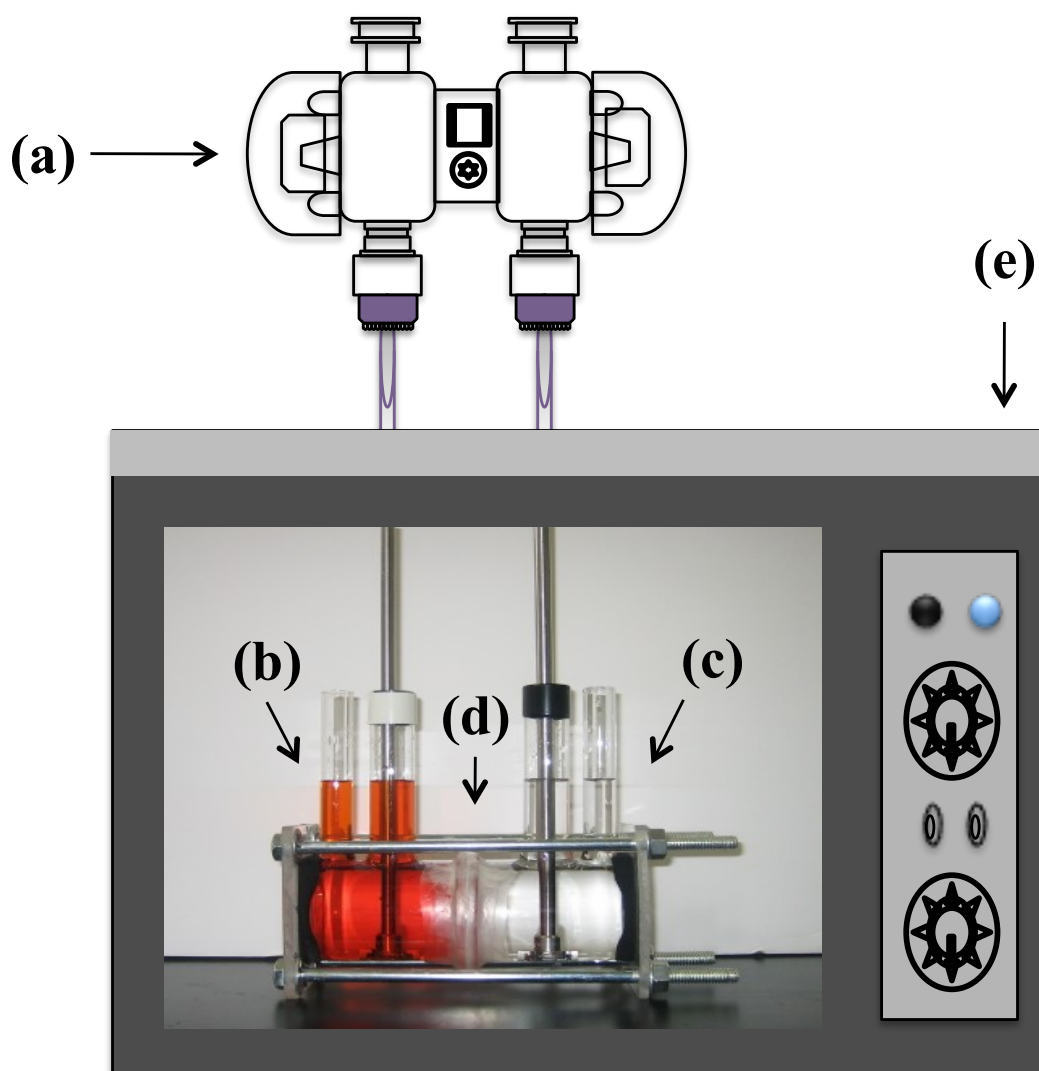


Figure 3-1 Schematic image of membrane mass transfer cells. (a) Agitating motor; (b) Mass-transfer cell (feed side); (c) Mass-transfer cell (stripping side); (d) Membrane (e) Thermostatic water bath (303K).



膜分離技術は極めて幅の広い科学技術から成り立っている。科学的成果の蓄積から成り立っている。膜による分離機構の焦点は膜に対する溶解現象と拡散である。その基本となるのは生体膜に優れた分子分画性能であるが、工学的な解析と応用分野の開発は化学工学がその中心を担っている。

拡散による物質の移動の定量的に扱う理論として、フィックの法則(Fick's Law)がある。濃度の異なる 2 つの溶液間において濃度差を距離（ここでは膜厚さ）で除した濃度勾配に比例して物質が拡散する。

ここで、膜の単位面積単位時間あたり通過分子の数を流束と定義する。物質量をモル数 (mol) として用いて表すと、流束  $J$  [ $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ]はフィックの法則により式 (3-1) により与えられる。

$$J_a = -D_a \frac{dC_a}{dx} \quad (3-1)$$

$D_a$ :透過物質  $a$  の拡散係数 [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$C_a$ :透過物質  $a$  の濃度 [ $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ]

$x$ :距離

(座標の正の方向は拡散方向であり、濃度が減少する方向である)

$dC_a/dx$ : $x$  軸方向の濃度勾配

### 3.2.2 総括物質移動係数の定義

本実験における指標物質の移動は、溶液本体から供給側の液境膜、高分子膜、透過側の液境膜を経て透過側の純水に至る過程である。指標物質の拡散は膜内に存在する水を含む分子レベルの透過経路を通じて生じる。細孔内の溶液と細孔壁との間に吸着平衡が成立し、このとき吸着された膜の壁面いわゆる透過チャンネルに沿って拡散する。種々の膜における移動速度を比較するため、指標物質の拡散速度を総括物質移動係数として表すこととする。指標物質の拡散過程のモデルを Figure 3-2 に示す。拡散の各過程、すなわち供給側の境膜、膜、透過側の境膜における流束はそれぞれ以下のように記することができる。本研究では膜が十分に湿潤状態にある場合、膜面と液本体の親水性成分の分配平衡定数を 1 と仮定する。すなわち  $C_{li} = C_{lm}$ 、 $C_{2i} = C_{2m}$

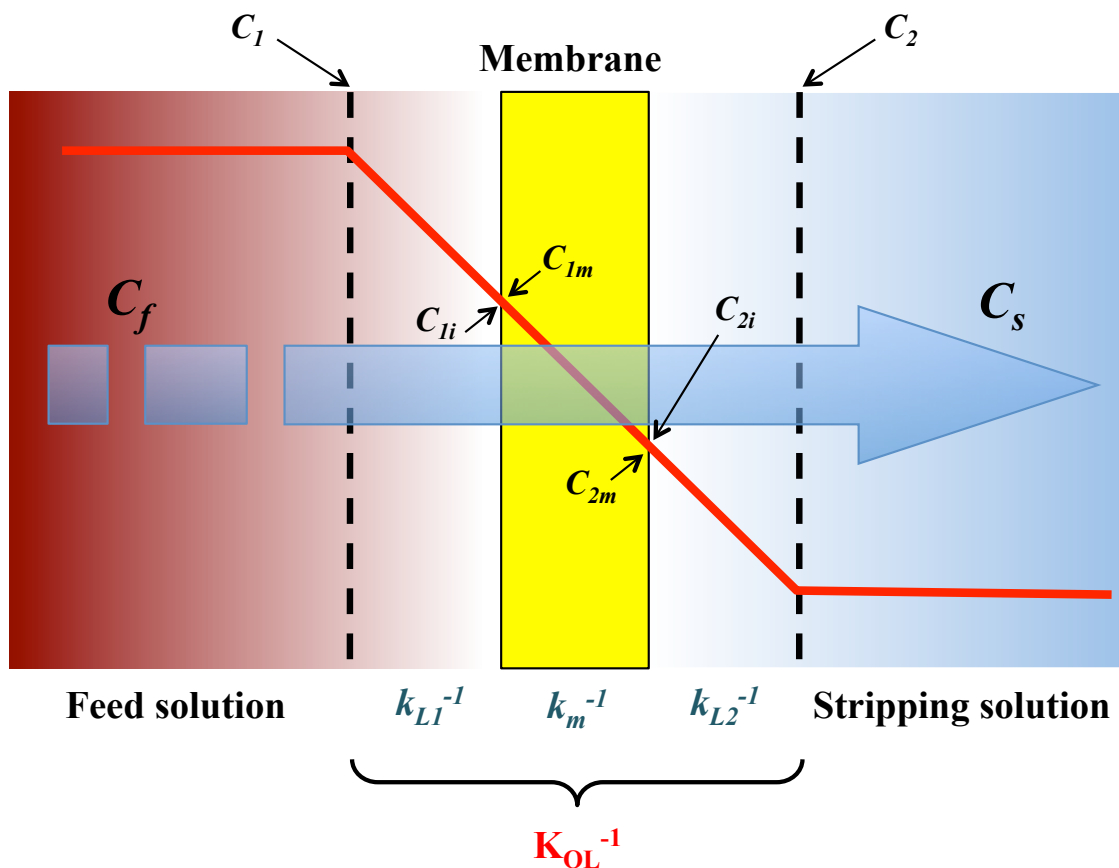


Figure 3-2 Analysis of mass transfer flux near by the membrane.

$C_f$ を供給側セル内の注目成分濃度[ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]、 $C_s$ を透過側セル内の注目成分濃度[ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]とし、膜を介した両セル内の濃度変化に基づいた物質収支式を導出する。すなわち、透過側の濃度変化に注目すると、物質移動流速  $N$ [ $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ]は、体積  $V$ [ $\text{m}^3$ ]の透過側セル内の成分濃度（モル数）の変化である。その流速を引き起こしているのは、膜の両側の濃度勾配を駆動力とする物質移動であり、これは膜面積と総括物質移動係数に比例する。

膜による物質移動流束  $N$ は

$$N = Ak_{L1}(C_1 - C_{1i}) \quad (3-2)$$

$$N = Ak_m(C_{1m} - C_{2i}) \quad (3-3)$$

$$N = Ak_{L2}(C_{2i} - C_1) \quad (3-4)$$

式 (3-2)、(3-3)、(3-4) を整理すると、

$$\frac{N}{A}(k_{L1}^{-1} + k_m^{-1} + k_{L2}^{-1}) = C_1 - C_2 \quad (3-5)$$

ここで、総括物質移動抵抗  $K_{OL}^{-1}$  は以下の式で表される。

$$K_{OL}^{-1} = k_{L1}^{-1} + k_m^{-1} + k_{L2}^{-1} \quad (3-6)$$

よって、式 (3-5)、(3-6) を整理して、

$$N = AK_{OL}(C_1 - C_2) \quad (3-7)$$

$N$ 、 $K_{OL}$ 、 $k_{L1}$ 、 $k_m$ 、 $k_{L2}$ 、 $A$  はそれぞれ物質移動流束、総括物質移動係数、供給側の境膜物質移動係数、膜内物質移動係数、透過側の境膜物質移動係数、膜面積である。また、 $C_1$  を供給側セル内の指標物質の濃度  $C_f$ 、 $C_2$  を透過側セル内の純水溶液  $C_s$  と置き換え、それぞれのセル内の濃度変化に基づいた物質収支の式を導出する。

### 【供給側の濃度変化に基づいた物質収支】

式 (3-7) において、物質移動流束  $N$  を  $C_f$  が膜面積を横切って  $C_s$  に 1 秒間に拡散する供給側の濃度変化速度に置き換える。

$$-V \frac{dC_f}{dt} = AK_{OL}(C_f - C_s) \quad (3-8)$$

供給側の濃度変化は常に減少するので、左辺は負の値を示す。また、供給側初期濃度を  $C_{fi}$  とすると、

$$C_{fi} = C_f + C_s \quad (3-9)$$

$$C_s = C_{fi} - C_f \quad (3-10)$$

式 (3-9)、(3-10)より

$$-V \frac{dC_f}{dt} = AK_{OL}(2C_{fi} - C_f) \quad (3-11)$$

式 (3-11)を  $t=0$ 、 $C_f=C_{fi}$ 、また、 $t=t$ 、 $C_f=C_f$  もとで積分すると、

$$\ln\left(\frac{2C_f}{C_{fi}} - 1\right) = -2\frac{AK_{OL}}{V}t \quad (3-12)$$

式 (3-11)における左辺を縦軸、時間  $t$  を横軸にとして求められた関係線の傾きとして  $-2AK_{OL}/V$  が算出できる (Figure 3-3)。A と V は既知であるので、これより総括物質移動係数  $K_{OL}$  を求める。

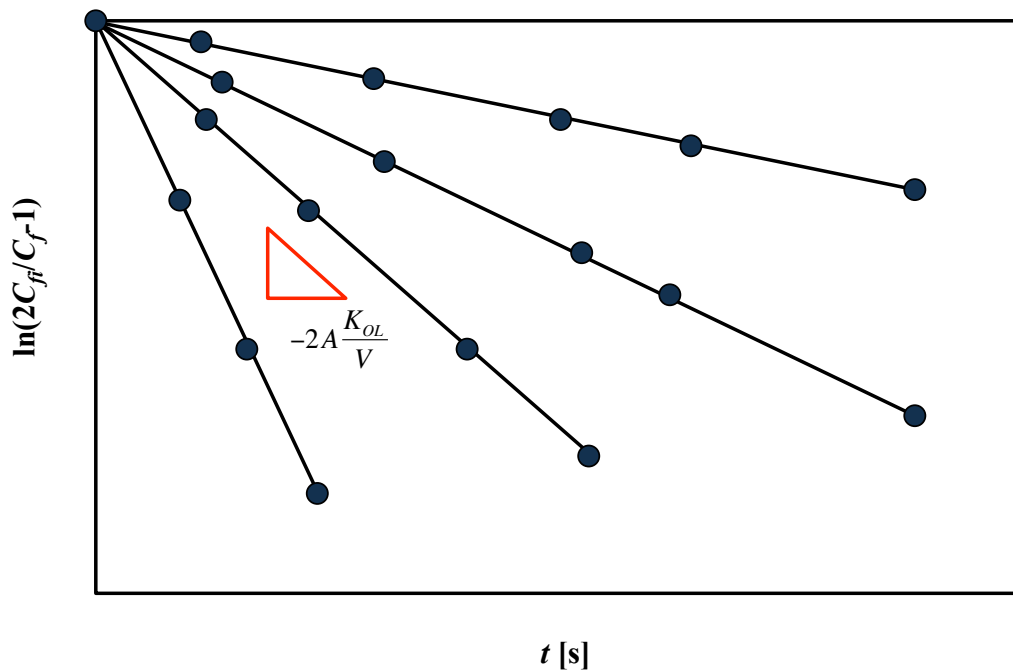


Figure 3-3 Time course of the concentration throughout the membrane.

### 3.2.3 膜内の拡散現象の性能評価としての有効拡散係数

$K_{OL}$  の逆数が総括物質移動抵抗  $K_{OL}^{-1}$  となるので、攪拌速度  $n$  についてプロットし、両対数プロットより依存性  $b$  を求める (Figure 3-4)。

$$K_{OL} \propto n^b \quad (3-13)$$

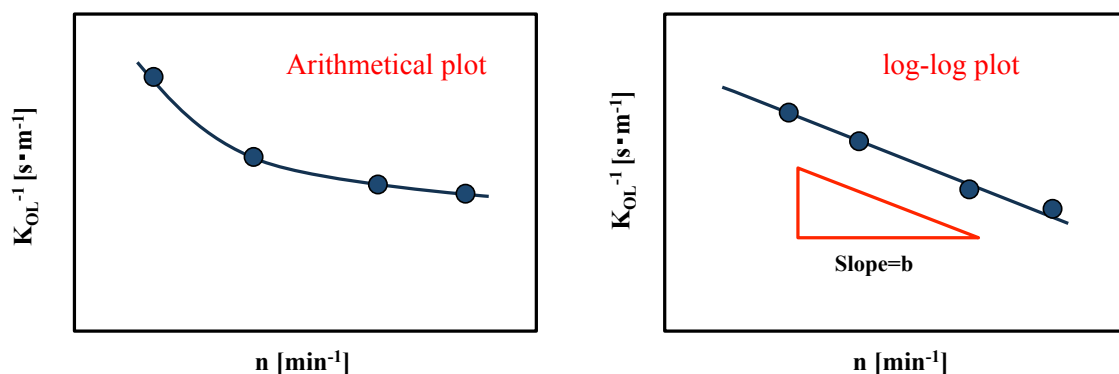


Figure 3-4 Effect of agitation rate on overall mass transfer resistance.

総括物質移動抵抗  $K_{OL}^{-1}$  を攪拌速度の依存性  $n^{-|b|} [(s^{-1})^{-|b|}]$  に対してプロットし、Wilson plot を作成する (Figure 3-5)。

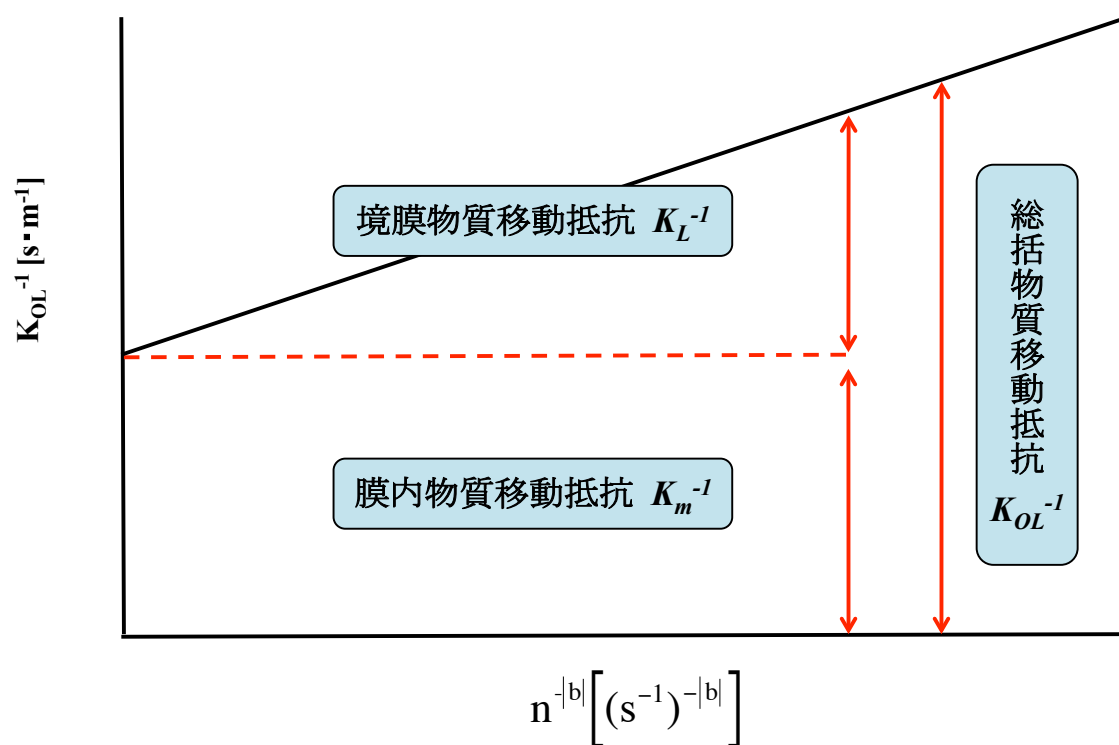


Figure 3-5 Wilson plot.

Wilson plot の切片は攪拌速度＝無限大を示す。すなわち、境膜物質移動抵抗  $k_{L1}^{-1}$  及び  $k_{L2}^{-1}$  を除いた膜内物質移動抵抗  $k_m^{-1}$  を評価することができる。これより、

式 (3-12)を用いて有効拡散係数  $D_{eff}$  を算出する。

$$k_m = \frac{D_{eff}}{l} \quad (3-14)$$

$D_{eff}$ : 膜内の有効拡散係数  $[\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$

$k_m$ : 膜内物質移動係数  $[\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$

$l$ : 膜厚  $[\text{m}]$

### 3.2.4 膜分離性能評価としての有効拡散係数

膜の物質透過性能評価のためには、分子構造並びに分子量の明確な溶質を選んで、透過流束を求め高分子膜内の有効拡散係数を測定し、これを高分子ネットワークの複雑さや膜の構造因子（空間率・迷宮度）を考慮して考察を展開することができる。

### 3.2.5 タンパク質による透過性能の測定

タンパク質の透過性能の評価は、限外濾過装置を用いて 2.3.5 に基づいて透過実験を行った。大きな分子の代表として BSA を取り上げた。透過流束は式(2-8)より求めた。

### 3.2.6 タンパク質による阻止率の測定

膜の分離性能を表すものとしてみかけ阻止率  $R_m[-]$  が用いられる。

$$R_m = \frac{c_f - c_p}{c_f} \quad (3-15)$$

$$R_m = 1 - \frac{c_p}{c_f} \quad (3-16)$$

ここで、 $c_f$  は供給側液濃度  $[\text{mol m}^{-3}]$ 、 $c_p$  は透過液濃度  $[\text{mol m}^{-3}]$  である。みかけ阻止率  $R_m$  は膜の透過経路によって溶質分子の透過が阻止される割合であるから、溶質の分子サイズによっても変化する。Figure 3-6 に分子量によって阻止率が変化

する様子（分画分子量曲線）を示した。一般には、阻止率  $R_m$  が 90% になる分子量をその膜の分画分子量と呼び、膜の分画性能を表す指標の一つとして用いられている。

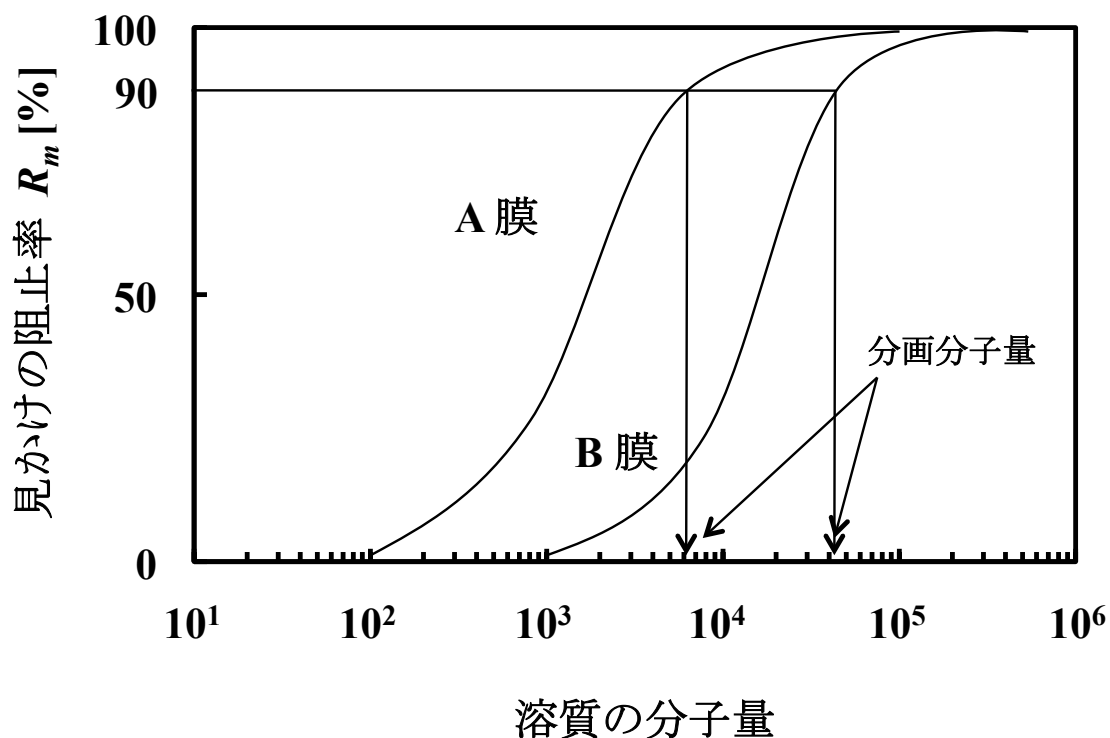


Figure 3-6 膜の分画分子量と分子量分画曲線。

みかけ阻止率  $R_m$  は操作条件によっても変化する。一般には、高い操作圧力による破過、高温による透過経路の熱拡張の条件下では  $R_m$  は低下する。したがって、分画分子量も操作条件によって変化する。

### 3.3 実験結果および考察

#### 3.3.1 有効拡散係数に対するタンパク質の分子量の影響

分子量の異なるタンパク質の代表として Lysozyme (14000Da)、Trypsin (20000Da)、Pepsin (34000Da)、Egg Albumin (43000Da) と Bovine Serum Albumin (BSA, 65000Da) を選択し、これらのタンパク質分子の表面改質を施した chitosan 膜内の有効拡散係数を求めた。各タンパク質の有効拡散係数に対する分子量の影響を Figure 3-7 に示す。14000Da から 65000Da の 4.6 倍タンパク質分子量の変域において、有効拡散係数として 330 倍の変化量を示し、顕著な分子分画機能を示した。なお、各タンパク質が単独成分として存在した場合の測定結果から、

求められた有効拡散係数であり、複数成分が共存した場合は比較的大きな分子であるタンパク質については別に測定する必要がある。

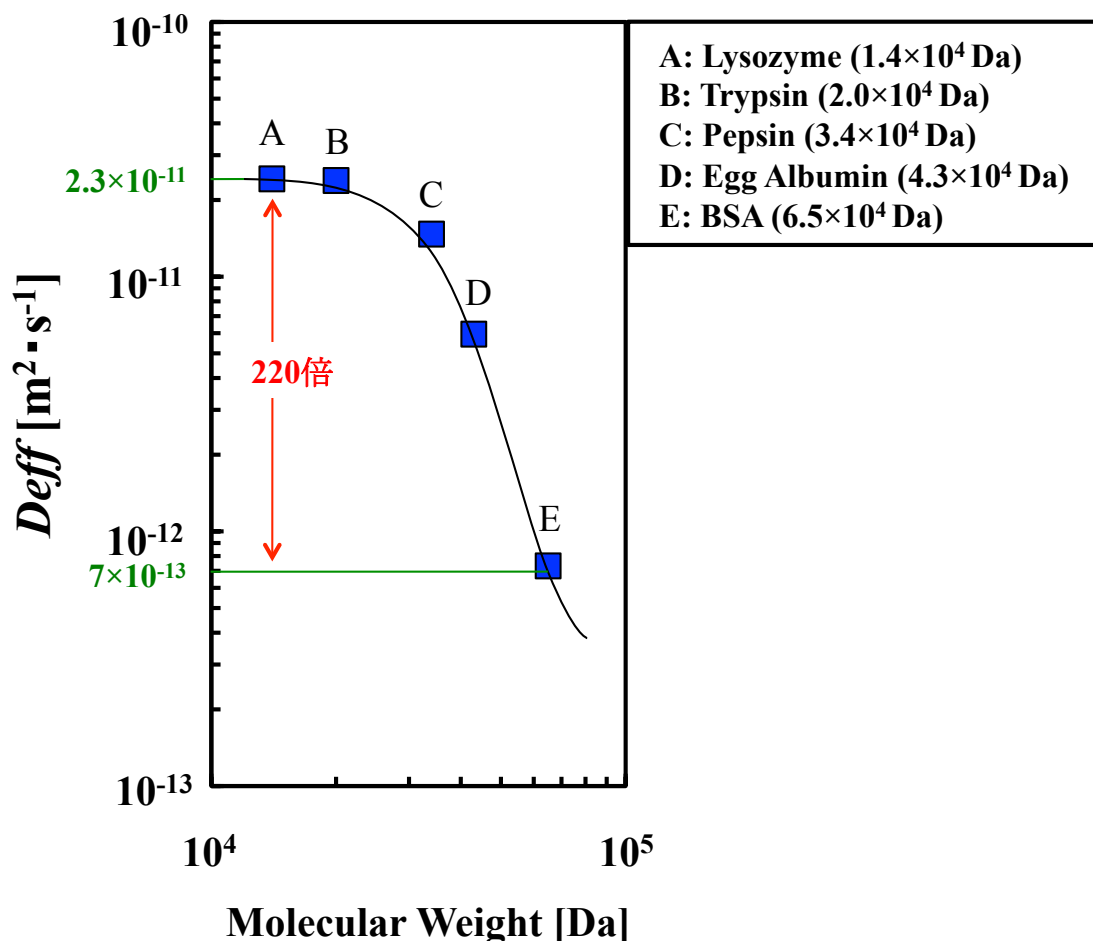


Figure 3-7 Effect of protein molecular weight on effective diffusion coefficient of surface modified chitosan membrane.

表面改質 chitosan 膜と表面改質していない chitosan 膜の有効拡散係数の比較は Figure 3-8 に示す。表面改質を施した chitosan 膜におけるタンパク質の有効拡散係数は特に低分子例でオリジナルの chitosan 膜より大きな値を示す。表面改質を施していない chitosan 膜では同じ分子量範囲で有効拡散係数の変化が 75 倍であり、表面改質によって選択性が 330 倍に高まったことは興味深い。また、低分子量例で有効拡散係数の値が大きくなる傾向がやや強く見られたのは、silica 微粒子が膜の内部にも及んでいるため、より小さな分子の透過において影響が強く現れたと考えられる。



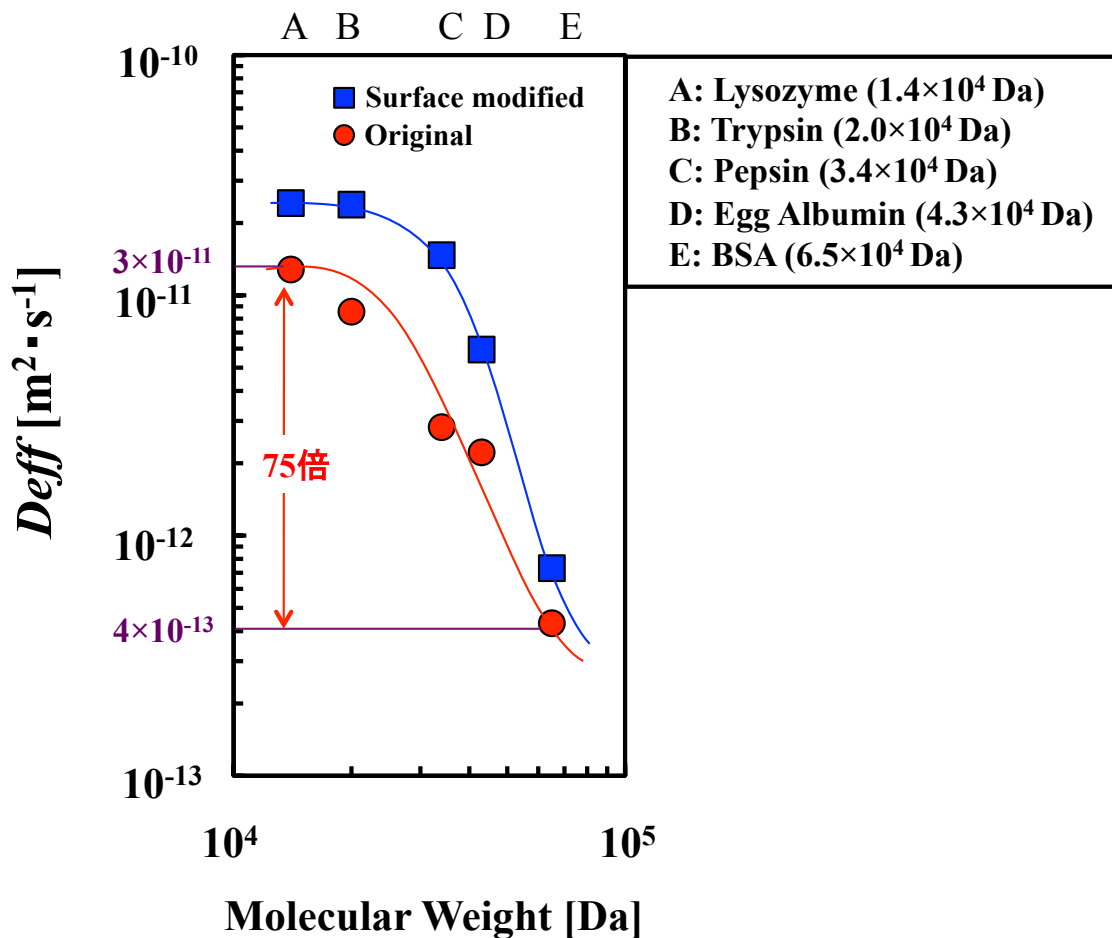


Figure 3-8 Comparison of surface modified chitosan membrane and conventional chitosan membrane on effective diffusion coefficient of protein molecular.

小さい分子量領域から大きい分子量領域 (タンパク質) までの物質において、chitosan 膜内の有効拡散係数の変化を明らかにするため、小さい分子の代表として、Methyl Orange (327Da)、Indigo Carmine (466Da)、Bordeaux S (604Da)、Rose Bengal (1017Da)の膜内の有効拡散係数を求め、上記のタンパク質の有効拡散係数とともにプロットし、総合的に考察を行った。Figure 3-9 に示したように、大きい分子群 (E~I) は表面改質 chitosan 膜によって分画できる可能性があり、小さい分子群 (A~D) は  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜によって分画できる可能性がある。なお、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の有効拡散係数の変化と表面改質 chitosan 膜の有効拡散係数の変化を示すカーブが二群に分かれている傾向を読み取ることができる。これは、同じ分子量の成分を両者の膜内を拡散させた場合、本研究の場合 chitosan 膜の方がより大きく拡散を示すことを示唆している

読み取れることができる。両者の polymer の架橋ネットワークの本質的な相違がこの二群に分かれたカーブとなって現れたものと考えられる。

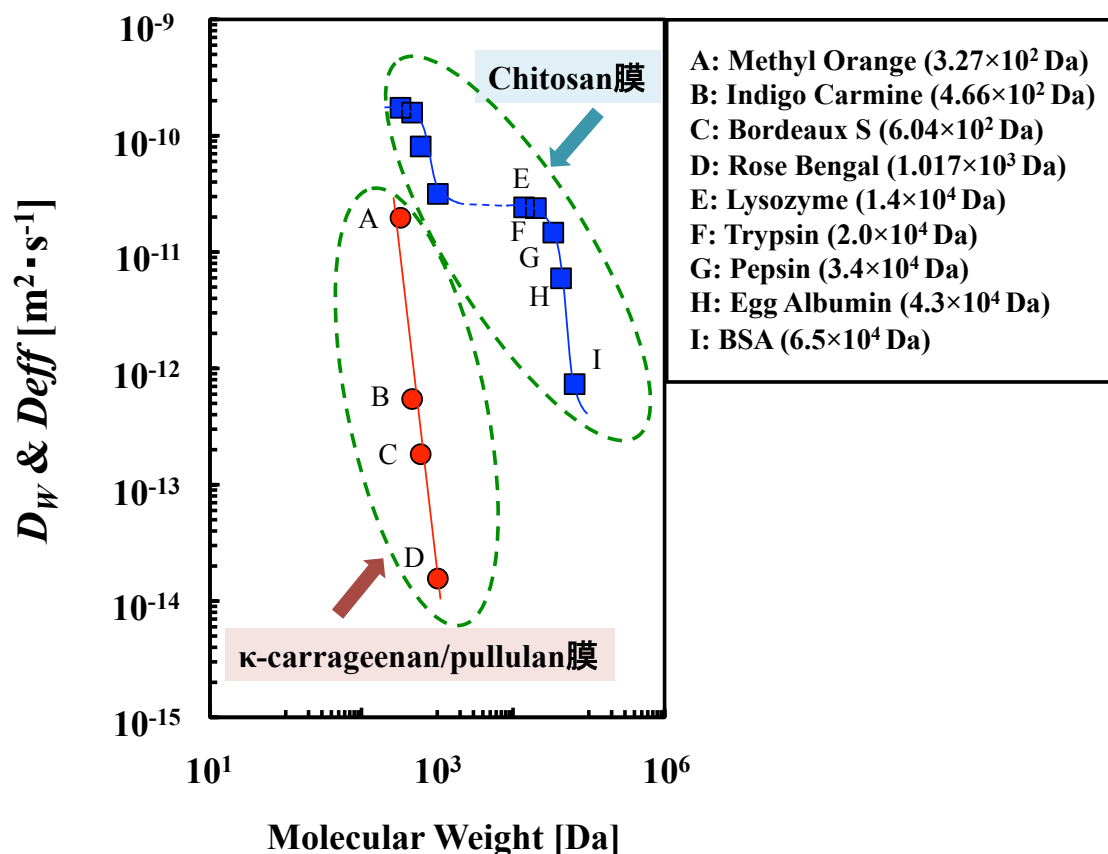


Figure 3-9 Effect of molecular weight on effective diffusion coefficient of chitosan membrane. Plots (A ~ D) were obtained by  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane, plots (E ~ I) were obtained by surface modified chitosan membrane.

### 3.3.2 タンパク質透過性能からみた表面改質の評価

Figure 3-10 に、純水の透過流束の時間変化を示した。表面改質前の chitosan 膜に対し、表面改質後の chitosan 膜の純水透過流束は純水系の場合約 1.4 倍に、BSA 水溶液の場合約 1.3 倍の増大を示した。透過流束は操作時間の間にほぼ一定であり、溶質を含む系であっても、膜の透過性能は安定していると言える。

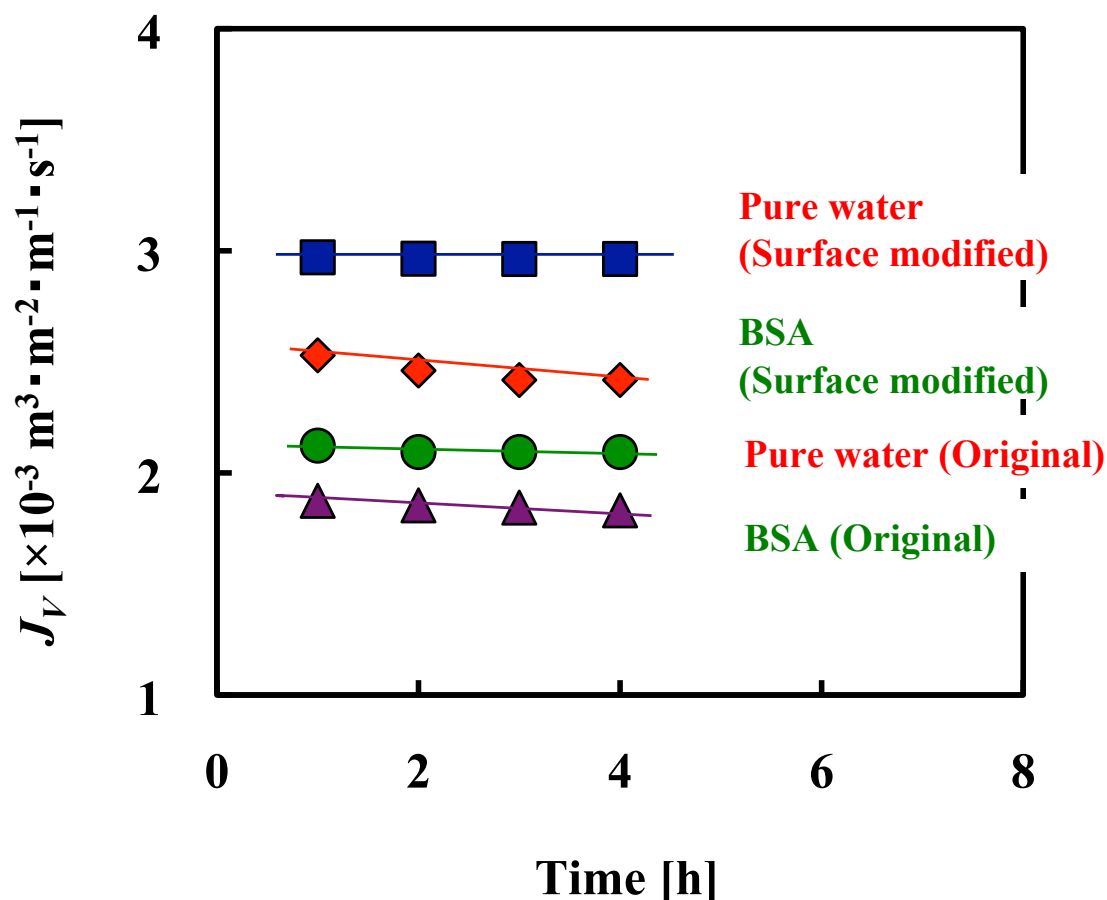


Figure 3-10 The water and BSA permeability on surface modified and conventional chitosan membrane.

純水の透過流束の向上について Figure 3-11 に詳しく示した。緑のバーが表面改質をしていない純水の透過流束を示す。これを 1 とすると、表面改質後の透過流束は 1.4 倍になった。1 枚の膜を用いても透過流束を向上させることが明らかとなった。また、BSA を含む水溶液の透過について、改質前の膜では BSA の存在によって、透過流束が 1 割減少する結果となった。一方、表面改質した膜では透過流束が 30% 向上した。この値は改質前の純水のみを経緯における透過流束よりも、なお、20% 高い値となっている。このことは、表面改質によってタンパク質が膜表面に留まっても、溶媒の流束の低下が抑制されることを示しており、膜の表面改質の有効性を示している。

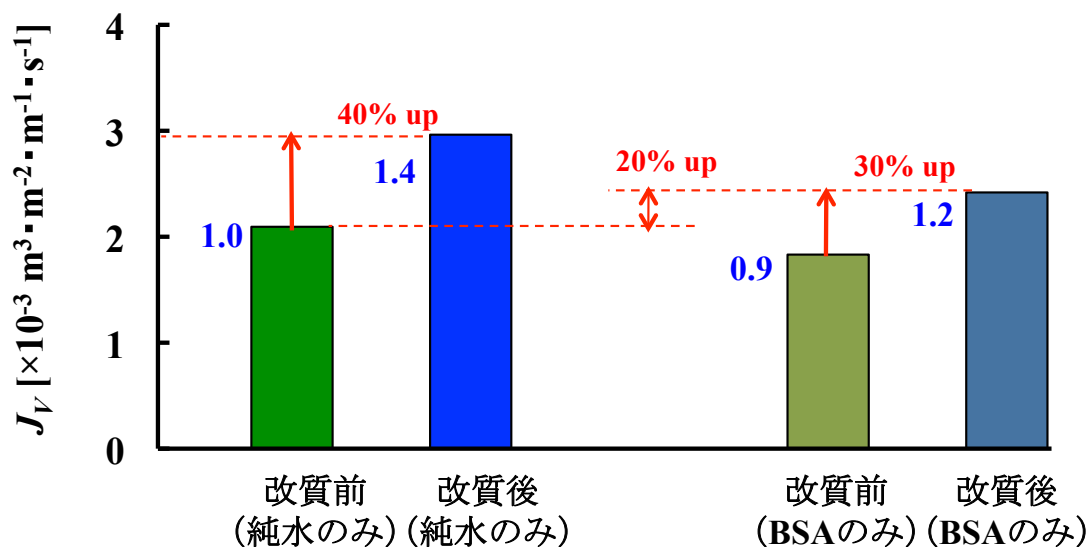


Figure 3-11 The water and BSA permeability on surface modified and conventional chitosan membrane.

### 3.3.3 タンパク質の分離性能からみた表面改質の評価

Figure 3-12 にタンパク質の分子量によって阻止率が変化する分子量分画曲線を示した。タンパク質の分子量と分子サイズを Table 3-1 に示す。タンパク質の分子量の増大に伴い、阻止率が増大したことから、chitosan 膜はタンパク質分子の大きさに従って分離機能を有していることが明らかとなった。

ただし、膜荷電とタンパク質の荷電によって、タンパク質が膜面に静電的な吸着が生じるため、膜透過流束、阻止率ともやや不安定であり、再現性の良いデータは得られなかった。単一系タンパク質溶液の分離実験の結果からは各種タンパク質の混合溶液では分子サイズに応じた分別分離の可能性が見出される。実際の混合溶液での分離実験を実施するのは今後の検討課題である。

Table 3-1 Molecular weight and molecular size of protein

Protein	Molecular weight [Da]	Estimated molecular diameter [Å]
Trypsin	20000	42
Pepsin	34000	50
Egg Albumin	43000	56
BSA	65000	64

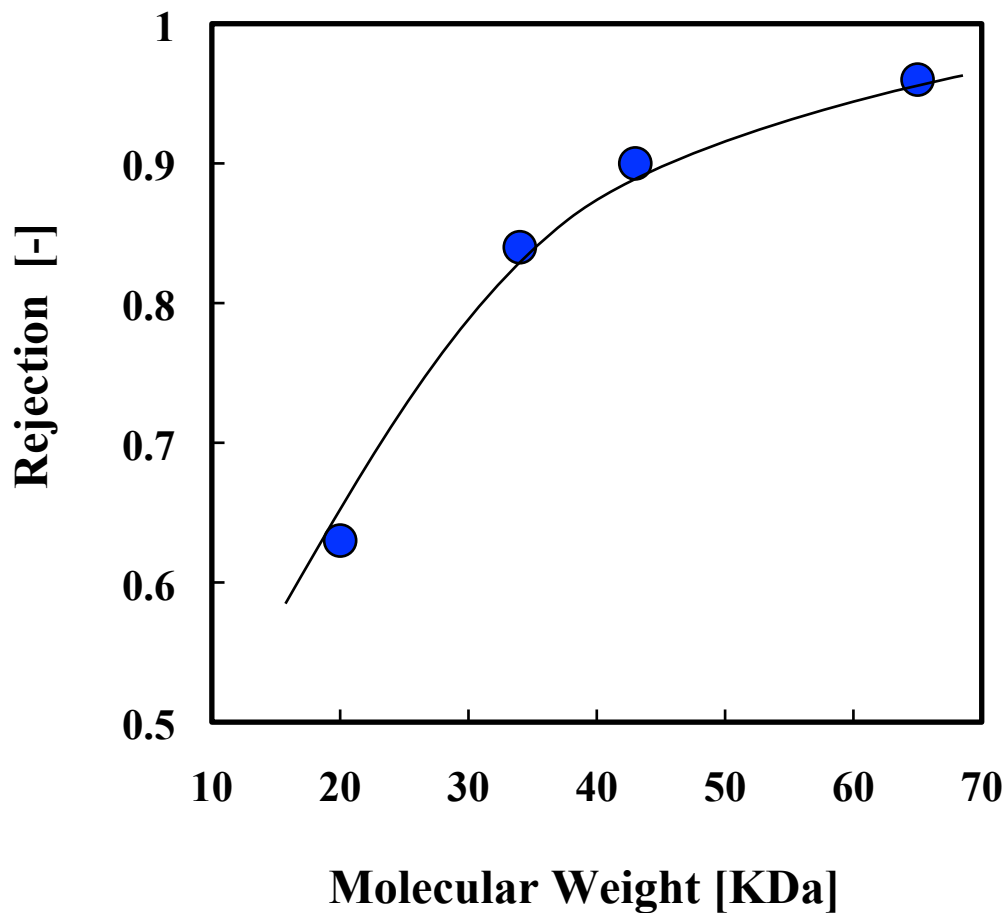


Figure 3-12 Selective curve of chitosan membrane for protein molecules.

### 3.4 本章の結論

本章では、chitosan 膜における分子量の異なるタンパク質 (Lysozyme (14000Da)、Trypsin (20000Da)、Pepsin (34000Da)、Egg Albumin (43000Da) と Bovine Serum Albumin (BSA, 65000Da)) を用い、濃度勾配による拡散実験並びに限外濾過実験を行い、タンパク質に対する分離特性を検討した。濃度差を推進力とするタンパク質分子の膜内拡散実験の結果より、分子量変域 14000Da から 65000Da に至る 4.6 倍の分子量変域において、表面改質 chitosan 膜では 330 倍に達する顕著な分子分画機能を示した。また、表面改質していない chitosan 膜より、表面改質した chitosan 膜の有効拡散係数の変域が拡大したことから、選択性の向上が認められた。これとともに silica 微粒子による微細な凹凸構造の形成が膜内部にも及び、有効拡散係数が大きくなる傾向が認められる。

タンパク質溶液の透過実験の結果から、膜面にタンパク質が静電的に吸着するため、透過チャンネルサイズが小さくなり、溶媒（純水）の透過係数が減少

した。ところが、表面改質した chitosan 膜における BSA 水溶液の透過流束は表面改質していない chitosan 膜の純水透過流束よりも約 20%高く、silica 微粒子による表面改質を施した chitosan 膜は高流束分離が実現できたと言える。

## 第4章 リガンドの導入により大きな分子群（タンパク質）の捕獲

### 4.1 本章の背景及び目的

リガンド (ligand) とは、ある物質 (本章の場合はタンパク質) に対して特異的かつ選択的に結合する物質で、色素もリガンドの一つである。リガンドが対象物質と結合する部分、すなわち結合部位 (binding site) は決まっており、目的成分に対して選択的で、かつ高い親和性を有している。生化学的親和性 (例えば酵素-基質、抗原-抗体間) を利用し、極めて高度な選択、分離を行う手段の一つがアフィニティークロマトグラフィーであるが、このクロマト支持体 (固定相) に色素を導入する考え方がある。色素型で有名なものにブルーデキストリンあるいはブルーセファロースなどよばれるものがある。これは塩化シアヌル構造 (反応基)、キノン構造 (色素) および親水部 (-SO<sub>3</sub>Na) を合わせ持った色素—例えば Cibacron Blue F3GA などをプロモシアン法によって活性化された多糖類 (アガロース、デキストランなど) に反応させたものである。

本章の目的は、分離係数の高い chitosan 膜にタンパク質の選択性リガンドである Cibacron Blue F3GA を導入し、大きな分子群 (タンパク質等) を選択的に膜面に捕獲することによって 上流側(Up Stream) の分離操作に相応しい高分子膜を調製することである。

### 4.2 実験系および解析法

#### 4.2.1 リガンドとする Cibacron Blue F3GA の導入

Cibacron Blue F3GA (CB) のトリアジン環にあるクロロ基とキトサンのアミノ基との求核置換反応によって共有結合し、アフィニティークトサンを調製した。膜を 1cm×1cm をカットし、各濃度 (0.005~0.2mM) に調製された CB 溶液に入れ、1g NaCl を添加し温度を 333K に設定し 1h 反応させた後、1g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を添加し、さらに 2h 反応させた。リガンドを導入した chitosan 膜は 10mM pH6.9 のリン酸緩衝液を洗浄液として、膜を繰り返し洗浄した。CB の最大吸収波長 598nm が洗浄後の液相では観察できなくなることで洗浄の終点とした。その後、洗浄液をメッサップし、予め作った CB の検量線を用いて濃度を計算した。

### Cibacron Blue F3GA coupled chitosan

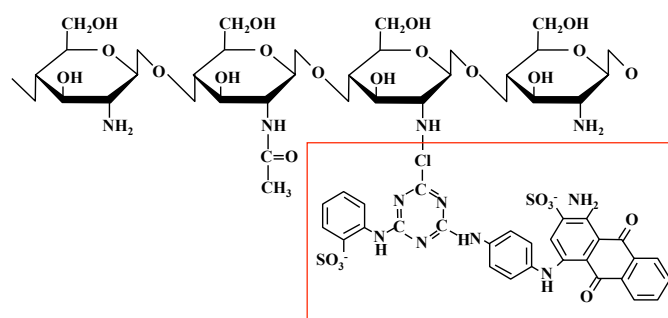


Figure 4-1 Scheme of cibacron blue F3GA coupled with chitosan chain.

#### 4.2.2 大きな分子群（タンパク質）を対象とした吸着平衡

標準タンパク質としてウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin (BSA) (65kDa))を用い、タンパク質吸着実験を行った。各濃度 (0.1~2g/L) に調製された BSA 水溶液 100mL にアフィニティーキトサン(1cm<sup>2</sup> 40 枚)を入れ、298K で吸着平衡に達するまで振盪させた。BSA 水溶液の平衡濃度は可視紫外分光光度計 (HITACHI, U-2900) にて 280nm の吸光度で測定した。吸着量  $Q$  は式(1)で表された。

$$Q = \frac{(C_0 - C_e) \times V_0}{m} \quad (4-1)$$

ここで、 $Q$  は吸着量[mol/L]であり、 $C_0$  は最初の仕込み濃度[mol/L]、 $C_e$  は吸着平衡に達した濃度[g/L]である。 $V_0$  は最初の仕込み液相体積[L]であり、 $m$  は膜の湿润質量[g]である。

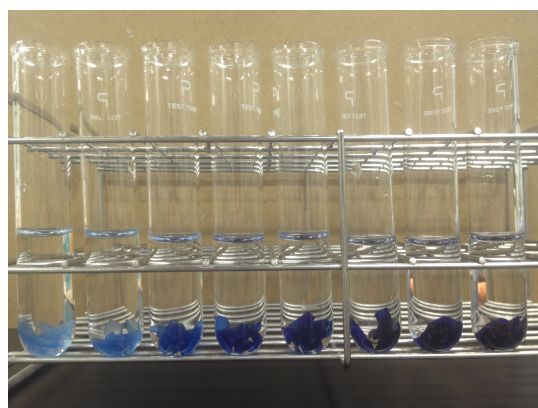
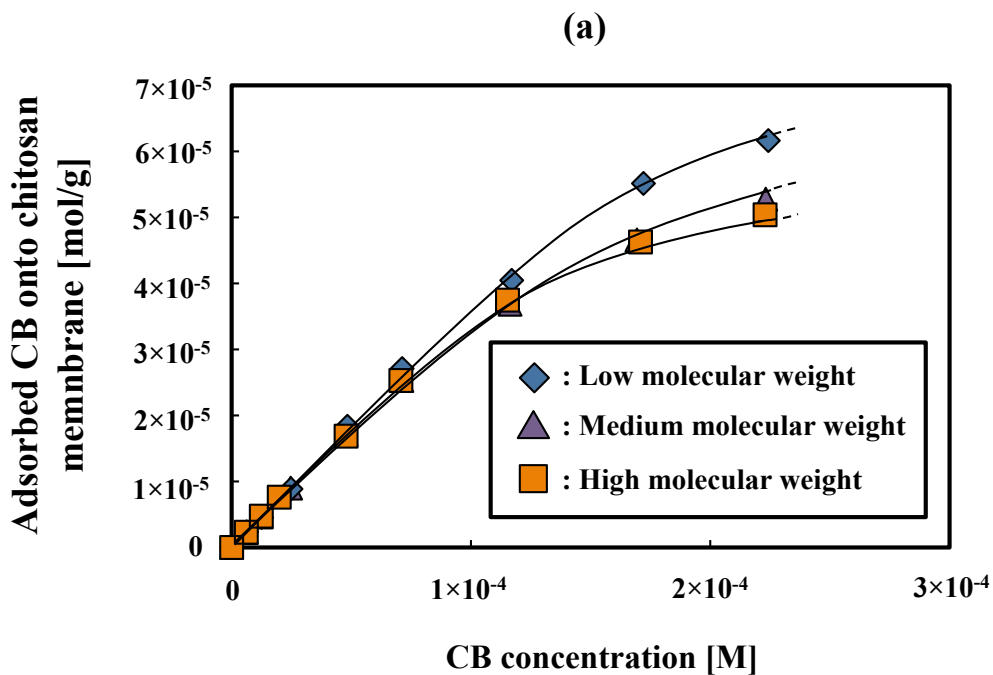
#### 4.3 実験結果および考察

##### 4.3.1 Chitosan 膜における Cibacron Blue F3GA の吸着特性

Figure 4-2(a)に、293K における三種類 (Low molecular weight, Medium molecular weight と High molecular weight) の chitosan 膜に対する Cibacron Blue F3GA (CB) の吸着等温線を示す。Cibacron blue の濃度の増大とともに、chitosan 膜に吸着した cibacron blue が増大し、多くのリガンドがキトサン膜に導入されることが明らかとなった。また、低分子量の chitosan 膜は cibacron blue に対する平衡吸着濃度が中、高分子量の chitosan 膜より高い。高分子量の chitosan 膜では膜構造が過



密となり、吸着サイトが十分に活かされていない可能性を指摘することができる。Figure 4-2(b)に、CBの供給濃度が高くなるに従って、キトサン膜に cibacron blue が多く吸着されていることが濃厚な染色によって確認された。



Low CB  
concentration

High CB  
concentration

Figure 4-2. (a) Cibacron blue F3GA adsorption on three types of chitosan membrane.

(b) The photography of CB coupled chitosan membrane within different CB concentration.

### 4.3.2 指標タンパク質(BSA)の吸着特性の評価

大きなタンパク質分子の代表として BSA を取り上げた。Figure 4-3 にリガンドを導入した chitosan 膜とリガンドのない chitosan 膜におけるタンパク質の吸着特性の比較を示した。リガンドを導入によって BSA の吸着量は 6.6 倍増大し、大きな分子の捕獲にリガンドの有効性が確認された。

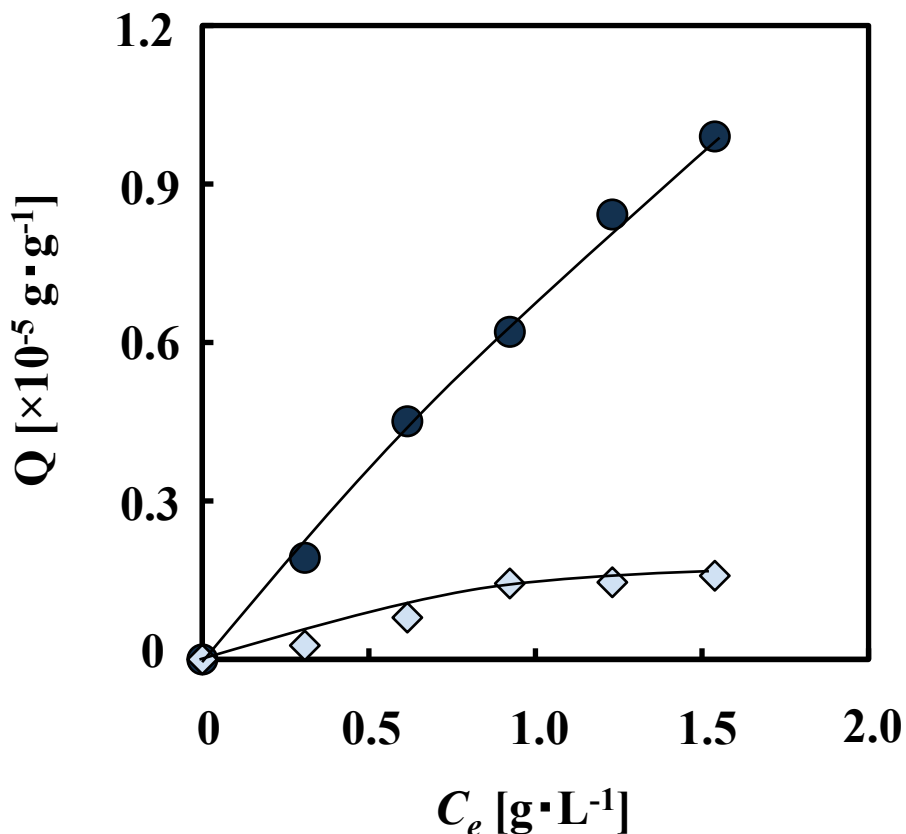


Figure 4-3 BSA adsorption onto the conventional (c) and surface modified (m) chitosan membrane.

### 4.4 本章の結論

本章では、膜分離プロセスの上流側を担当する chitosan 膜にタンパク質分子に対する特異的吸着性能を持つリガンド (Cibacron Blue F3GA)を導入し、より効率よくタンパク質を捕獲した。

リガンドを導入した chitosan 膜は指標タンパク質の代表として BSA の吸着量は 6.6 倍増大した。タンパク質吸着能を有する官能基を chitosan 分子鎖に固定することで、タンパク質の高効率捕獲と溶媒の高流速透過が両立できる。高速吸着処理と溶媒の高流速が実現できる高分子膜の調製に成功した。これは、膜表面に形成された微細な凹凸構造による透過流速の向上と、リガンドによる高

効率タンパク質の捕獲が両立できたことを示している。本研究の膜分離プロセスの上流側に担当する分離膜として十分期待できる。

第5章 濃度差を駆動力とした膜分子分画機能の評価

5.1 本章の背景および目的

多糖類は水溶液において、規則的な立体構造を保持することは広く知られている。多糖鎖間の相互作用と架橋領域形成は、他の多糖高分子の導入または架橋剤の添加によって影響され、この多糖高分子内のセル構造の変化によって機械的な特性が変化する。また、ゲルの膨潤理論によれば、架橋点密度が小さいほどゲルは膨潤できる可能性が高くなる。したがって、高分子ゲルの膨潤倍率を上げるためには架橋点密度を低下させればよいが、ゲルの機械的強度も大幅に低下して、場合によっては膨潤とともに自然にゲルは壊れてしまう。一般に、高い膨潤倍率と機械強度は相反する性質となっている。しかも、通常の高分子ゲル内部での架橋点の分布は著しく不均一であることがよく知られており、その結果、ゲルの膨潤は長い高分子鎖によって制限される傾向があり、短い高分子鎖上の架橋点の寄与は相対的に小さいと言える。

本章の目的は、簡便な製膜方法としてキャスト法を用いて、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合自立膜の製膜手法を確立し、 $\kappa$ -carrageenan の質量割合、製膜温度と架橋因子など複合高分子骨格の制御因子を検討して、分子サイズ認識能力の検証とその制御の可能性を探ることである。 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜のネットワークの形成について、モデル図は Figure 5-1 に示す。

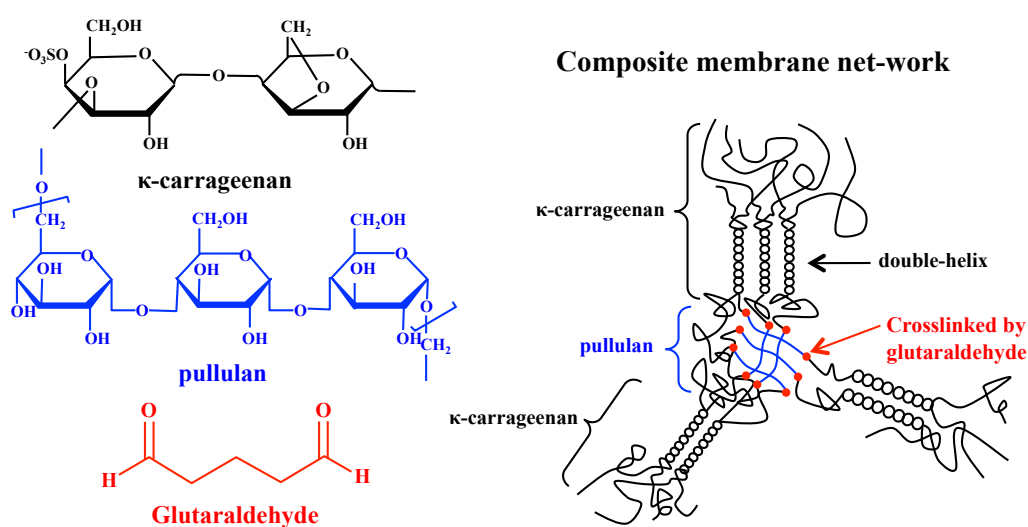


Figure 5-1 Image of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite polymer chain.

## 5.2 実験系および解析法

### 5.2.1 架橋手法と製膜条件の検討

複合膜の  $\kappa$ -carrageenan の存在割合を制御因子として取り上げた。 $\kappa$ -carrageenan の質量割合 ( $F_C$ ) は式 (5-1)を用いて定義し、 $F_C$ を Table 5-1 に示す。

$$F_C = \frac{\kappa - carrageenan [g]}{\kappa - carrageenan [g] + pullulan [g]} \quad (5-1)$$

Table 5-1 Mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan in the composite membrane

$F_C$ [-]	$\kappa$ -carrageenan [g]	Pullulan [g]
0.00	0.0	3.0
0.33	1.0	2.0
0.55	1.5	1.5
0.60	2.0	1.0
0.83	2.5	0.5

#### $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の調製

バイアルビンに純水を 97g に入れ、各  $F_C$  に調製された混合高分子 ( $\kappa$ -carrageenan & pullulan) 総重量 3g を添加し、343K を設定した恒温水槽に 1 時間攪拌して溶解させる。混合水溶液に架橋剤として、濃度 50~130mM のグルタルアルデヒド (約 5mL) を添加し、さらに 343K、1 時間攪拌して  $\kappa$ -carrageenan/pullulan の混合流涎液を調製した。プラスチック製のシャーレ(内径 90mm)に 20g の流涎液を分注し、熱風乾燥器 (338K) で 24 時間乾燥させることにより、乾燥状態の膜を製膜した。乾燥状態の膜は自然にシャーレから脱離する。注意深くピンセットを用いて、シャーレから取り出し、塩化カリウム水溶液 (0.1~1.1M) に 24 時間浸漬して架橋させる。架橋反応終了後、純水で膜表面を洗浄し、余剰のグルタルアルデヒドと塩化カリウム水溶を除いて、物質透過の実験に供した。複合膜の調製プロセスのモデル図を Figure 5-2 に示す。

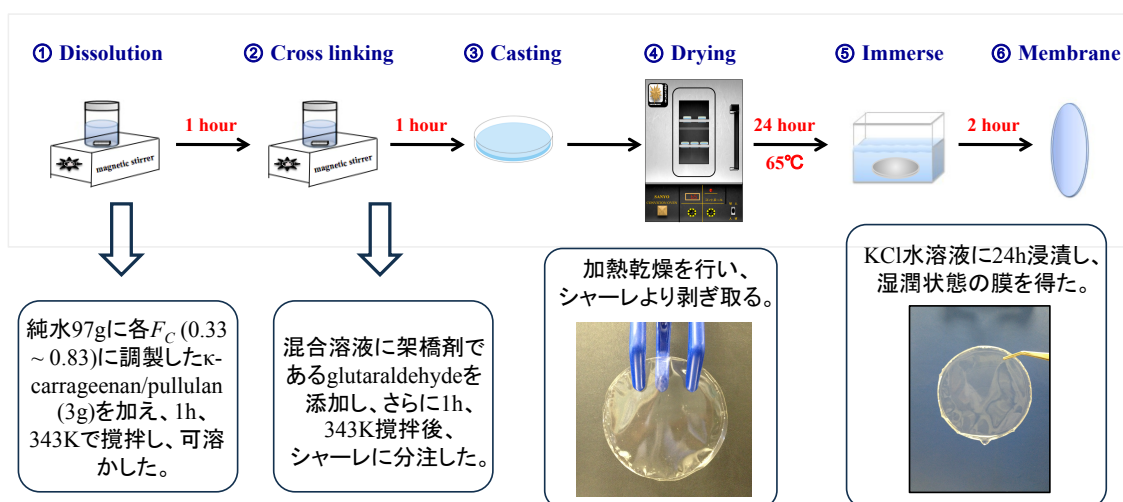


Figure 5-2 Preparation of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane.

### 5.2.2 膜の含水率測定

膜の含水率は湿潤時の重量と乾燥時の重量との差から求められる。本研究において、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜を室温 ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) で純水に 24 時間浸漬させ、湿潤の平衡状態と見なした。湿潤時の質量を測定する際に、水から取り出して、付着している水を手早く乾いた濾紙で拭き取り、膜表面の付着水分を取り除く。膜を  $4\text{cm} \times 4\text{cm}$  正方形にカットし、予め質量を計ったシャーレに載せて、総質量 (膜とシャーレの合計質量) を計った後、 $338\text{K}$  の熱風乾燥器で 24 時間乾燥させた。湿潤基準の含水率は式 (5-2) を用いて求めた。

$$W_t \% = \frac{w_s - w_d}{w_s} \times 100 \quad (5-2)$$

ここで  $W_t$  は湿潤基準の膜の含水率である。 $w_s$  は湿潤時の膜の質量であり、 $w_d$  は乾燥時の膜の質量である。

### 5.2.3 機械的強度の測定

本章の背景にも述べたように、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜のネットワークは、まず、架橋剤とするグルタルアルデヒドの脱水縮合によって pullulan 分子を架橋する。その後、 $\kappa$ -carrageenan 分子のアンヒドロ- $\alpha$ -D-ガラクトースの環状酸素とカリウムイオンの間分子鎖内架橋の形成による集合された二重螺旋構造によ

て架橋された pullulan ネットワークを絡み合うことにより、強固な複合膜ネットワークを形成した。自立複合膜創成に対する架橋剤添加量の影響は高分子膜の製膜上重要分野であり、機械的強度はこの点で有用な指標である。機械的強度試験の評価は「2.2.4 機械的強度の測定」に従い、レオメータを用いた引っ張りによる膜の破断実験を行った。膜破断時の最大応力[Pa]と最大伸長率[%]を測定した。

## 5.2.4 走査型顕微鏡 (SEM) による膜構造の解析

走査型顕微鏡 (SEM) 観察のために「5.2.1 架橋手法と製膜条件の検討」に従って  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜を調製し、湿潤状態の膜を液体窒素中に浸漬し凍結させた。完全に凍結した膜を真空凍結乾燥機 (RLE-103, Kyowa Vacuum Engineering. Co., Ltd., Tokyo) を用いて乾燥させた。

それぞれの試料はカーボンテープを貼付けたサンプルディスクの表面に設置し、イオンスパッター (E-1010 Ion Sputter, Hitachi, Ltd., Tokyo) を用いて金属 (Pt) 蒸着処理を行った。調製した試料を SEM (Miniscope TM-1000, Hitachi. Ltd., Tokyo) により観察した。

## 5.3 実験結果および考察

### 5.3.1 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の製膜手法の確立

架橋反応とは、複数の官能基を有する低分子化合物の分子間反応や高分子化合物が分子間で共有結合し、三次元網目構造を形成することである。十分に架橋した高分子では分子量が無限大であり、どのような溶剤にも溶解しないし、加熱しても溶融しない。架橋点形成に利用される化学反応自体は特別なものではなく、有機化学や無機化学で取り扱われる一般的な反応であることが多い。しかし、架橋重合体形成することができる物質としては、これらの反応を起こしうる官能基を1分子中に複数個含む化合物や、官能基を側基に含む高分子である。架橋体を形成する高分子の中心は光、あるいは熱を用いることにより架橋重合反応を開始または促進させるものがある。本研究では、架橋剤としてグルタルアルデヒドを用い、pullulan 分子の水酸基を脱水縮合反応させ、pullulan のネットワークを形成させた。しかし、Figure 5-3 に示すように、pullulan 単独系膜は機械的強度が脆弱で機械的強度の不足によって膜分離プロセスに利用できない。

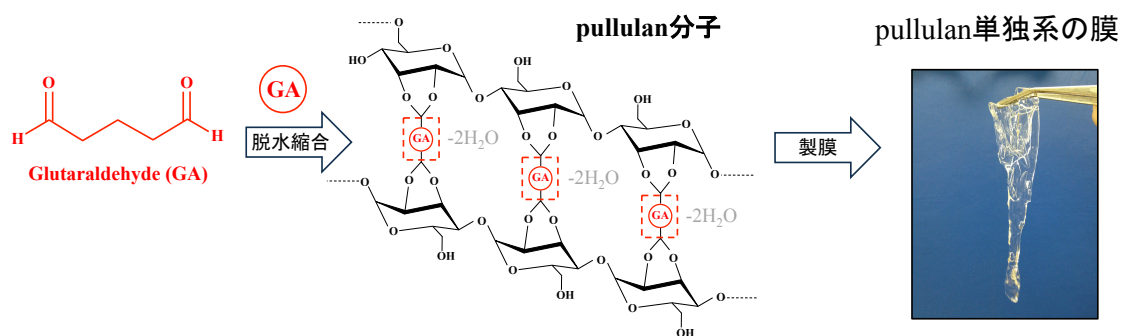


Figure 5-3 Crosslinked pullulan molecule by glutaraldehyde.

本研究の特徴の一つは、Figure 5-4 に示すように  $\kappa$ -carrageenan と複合させ、 $\kappa$ -carrageenan の二重螺旋構造が架橋された pullulan ネットワークに絡み合うことによって、透明でかつ機械的強度に優れた自立複合膜の調製に成功した点である。

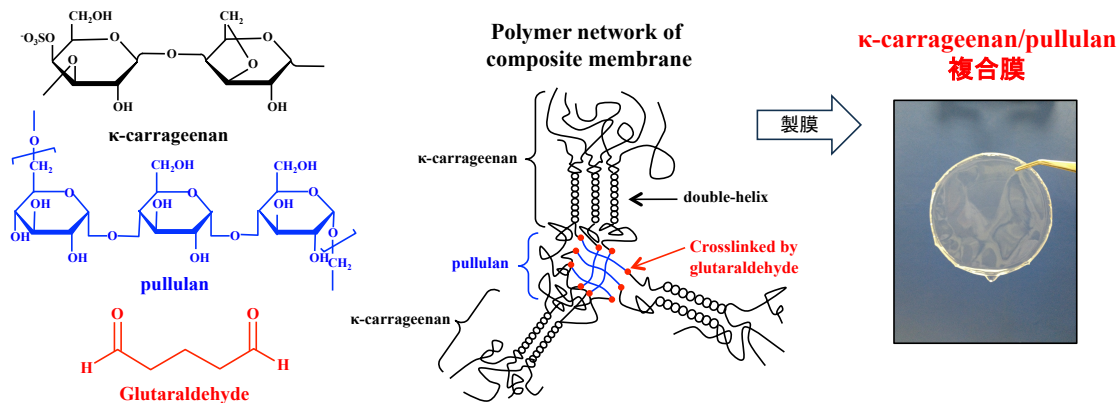


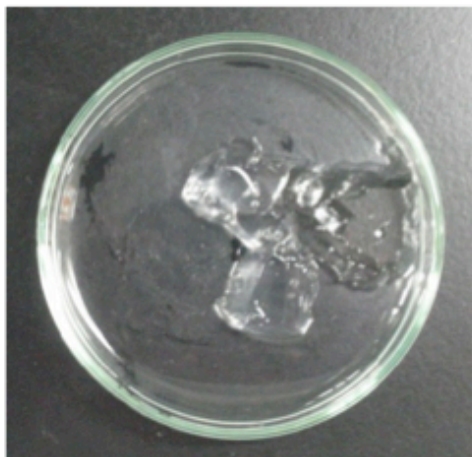
Figure 5-4 Image of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite polymer chain.

#### 製膜性に対する加熱温度の影響

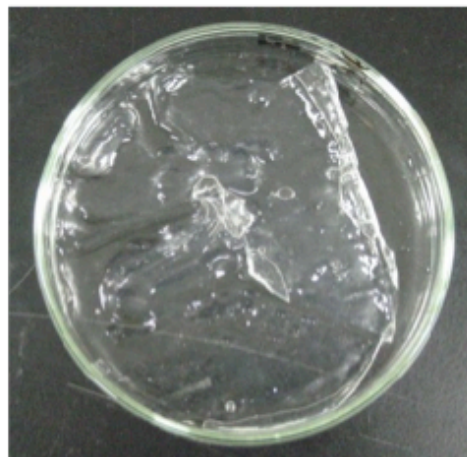
$\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の調製において、グルタルアルデヒドを添加した後、自発的な高分子のゲル化は見られなかった。グルタルアルデヒドを添加した混合液（流涎液）をシャーレにキャストした。自然乾燥（ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ）及び熱風乾燥機を各温度（ $45^\circ\text{C}$ 、 $65^\circ\text{C}$ 、 $85^\circ\text{C}$ ）にし、複合膜を乾燥させた。実験結果より、室温（ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ）の状態で一週間くらい放置したキャスト液はゲルの状態に留まり、製膜には至らなかった。Figure 5-5 は各温度条件で 24 時間乾燥させ、純水に浸漬して得られた膜の写真である。四つの温度条件の比較により、 $65^\circ\text{C}$



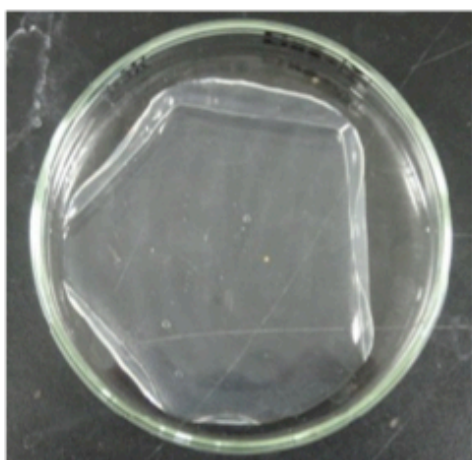
で乾燥させた膜は優れた機械的強度を示し、実用に供し得る製膜条件として認められる。



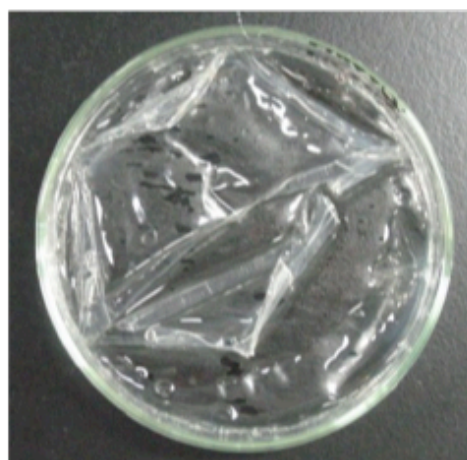
**Room temperature 25°C**



**45°C**



**65°C**



**85°C**

Figure 5-5 The crosslinking states of pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane after drying at different temperatures. (GA 70mM,  $F_c$ 0.33)

### 5.3.2 機械的強度からみた最適架橋条件

#### グルタルアルデヒドの影響

Figure 5-6 に示すように、架橋剤としてのグルタルアルデヒドの濃度の上昇にともない、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜破断時の最大剪断応力が上昇し、最大伸長率が低下した。このことは、プルランの架橋が高濃度のグルタルアルデヒドの添加によって進むことを示している。架橋の進行により、膜内ネットワーク構造が緻密になり、機械的強度が増大するとともに、弾性を示す伸長率が低下したと考えられる。また、グルタルアルデヒド濃度は 70mM 以上で複合膜の機械的強度の増大傾向が頭打ちでほぼ一定になったことから、架橋が飽和に達したことが考えられる。

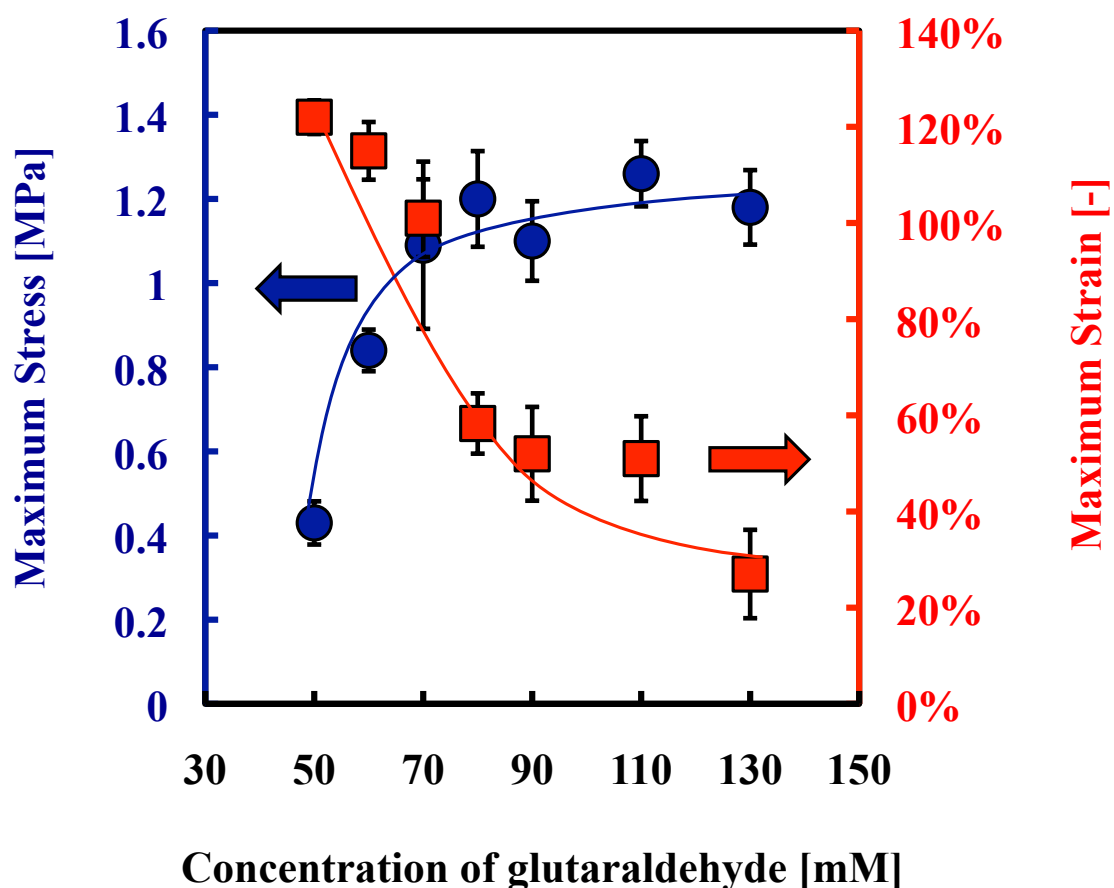


Figure 5-6 Effect of additive glutaraldehyde concentration on the maximum stress and the strain of prepared  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane.  $F_C$  was set at 0.33.

## 塩化カリウムの影響

$\kappa$ -carrageenan の質量存在割合を複合膜の機械的強度並びに物質透過特性を決定する制御因子として取り上げた。したがって、KCl の添加濃度が協動的に  $\kappa$ -carrageenan 分子の二重螺旋構造を構築し、KCl の添加量による  $\kappa$ -carrageenan 分子間内に二重螺旋構造の形成状況を把握するため、最も  $\kappa$ -carrageenan 存在割合の大きい膜( $F_C$ 0.83)に注目して KCl の影響をしらべた。Figure 5-7 に示すように、塩化カリウムの添加量が 0.7M (30mL) 以上は膜の機械的強度が最大値に達した。硫酸基と  $K^+$  の間に静電気結合による二重螺旋構成を促進させる最適な電解質濃度を見出した。

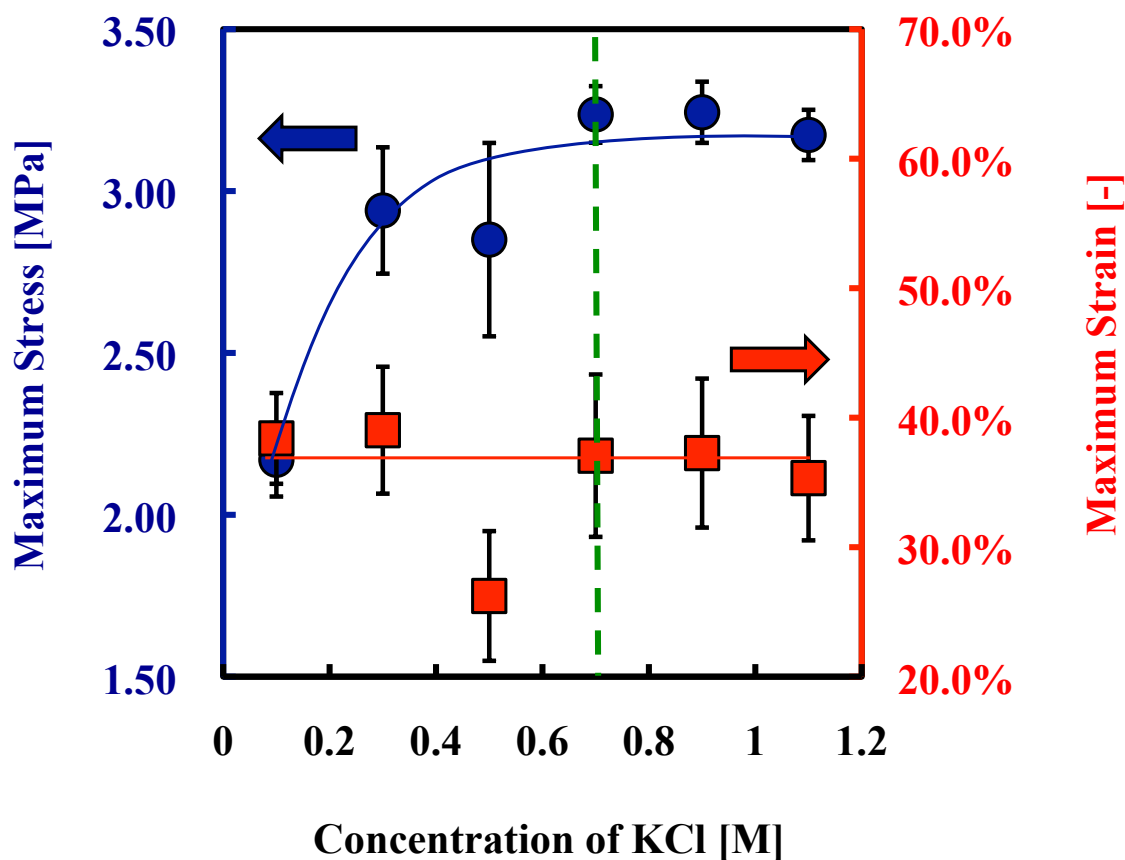


Figure 5-7 Effect of additive KCl concentration on the maximum stress and the strain of prepared  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane.  $F_C$  was set at 0.83.

Figure 5-6 と Figure 5-7 の結果に基づき、本研究ではグルタルアルデヒドを 90mM、塩化カリウムを 0.7M に設定し、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 膜を調製した。

### $\kappa$ -carrageenan の質量存在割合影響

$\kappa$ -carrageenan の質量存在割合に対する膜の機械的強度の影響を Figure 5-8 に示す。 $\kappa$ -carrageenan の質量存在割合は高くなるとともに、膜の機械的強度はその一次に比例して増大した。一方、膜の伸長率は徐々に低下し、約 35% に収束して一定に達した。全体として膜強度の増大とともに、膜の硬直化が見られる。本研究で用いた膜は図中の緑でマークした領域である。

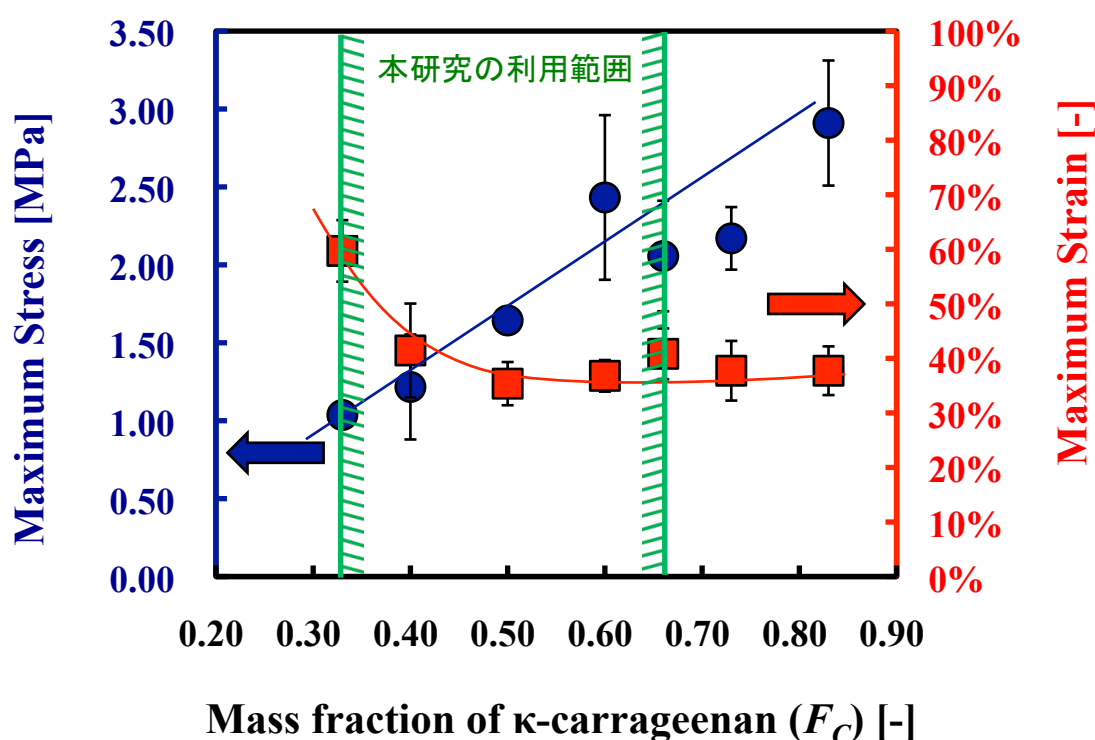


Figure 5-8 Effect of  $F_C$  on the maximum stress and the strain of membrane. The concentration of GA and KCl were set at 90mM and 0.7M, respectively.

### 5.3.3 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の膨潤特性と含水率

親水性の膜において湿潤膜内の含水率を把握することは重要である。加熱乾燥による質量変化から求めた膜内の質量含水率 ( $W_t=(w_s-w_d)/w_s$ ) に対する  $\kappa$ -carrageenan の質量存在割合の影響を Figure 5-9 に示す。 $\kappa$ -carrageenan の質量存在割合  $F_C$  の増大に伴い質量含水率は増大する。一般的に考えると、含水率が高い状態では膜の膨潤が見られるので、機械的強度が低下する傾向が予想される。本研究の複合膜では  $F_C$  の増大にともなって最大強度は増大 (Figure 5-8) しており、一般的な傾向と異なり、湿潤状態が高くても、膜強度が高い点で優れている。

ると言える。また、含水率が高い状態では膜内の物質透過経路が拡張することが期待できるため、有効拡散係数が大きくなり、その分物質移動の流束が大きくなる。ただし、鋭敏な分子サイズ認識能力が維持できるか否かを個別に検討する必要がある。全体を通じて、丈夫で物質透過に優れた複合膜である可能性が期待できると考えられる。

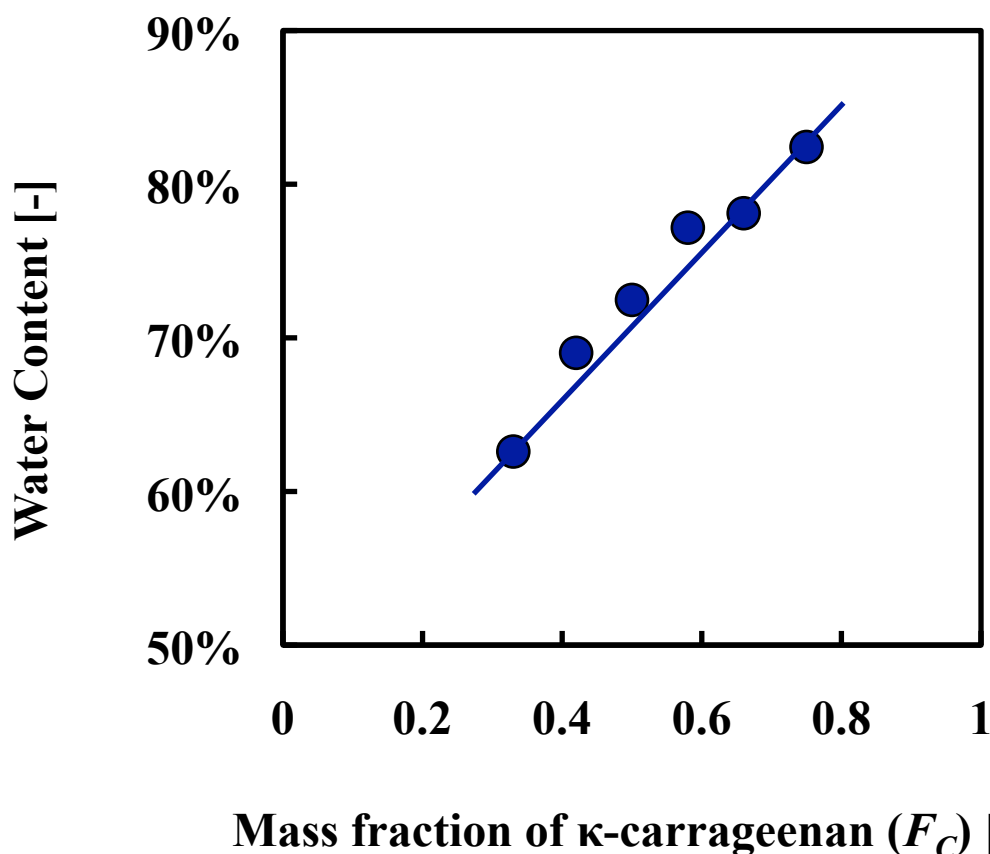


Figure 5-9 Effect of  $F_C$  on water content of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane.

### 5.3.4 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 存在割合 ( $F_C$ ) による膜の基本特性の変化

Figure 5-10 に  $\kappa$ -carrageenan の質量存在割合 ( $F_C$ ) が異なる複合膜の膜断面の SEM 像を示す。 $F_C$  の低い膜では破断面が均一であるが、 $F_C$  の高い膜では破断面の粗雑さが観測される。これは、糖鎖ネットワークが硬直化したことにより、応力が破断面に集中したことを示している。また、製膜工程における乾燥並びに架橋時に空気界面側に接していた面と、シャレー底面に接していた面において対称性が認められ、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜が対称膜であることが判断できる。本研究で使用した膜は図中の緑で囲んだ領域の膜である。

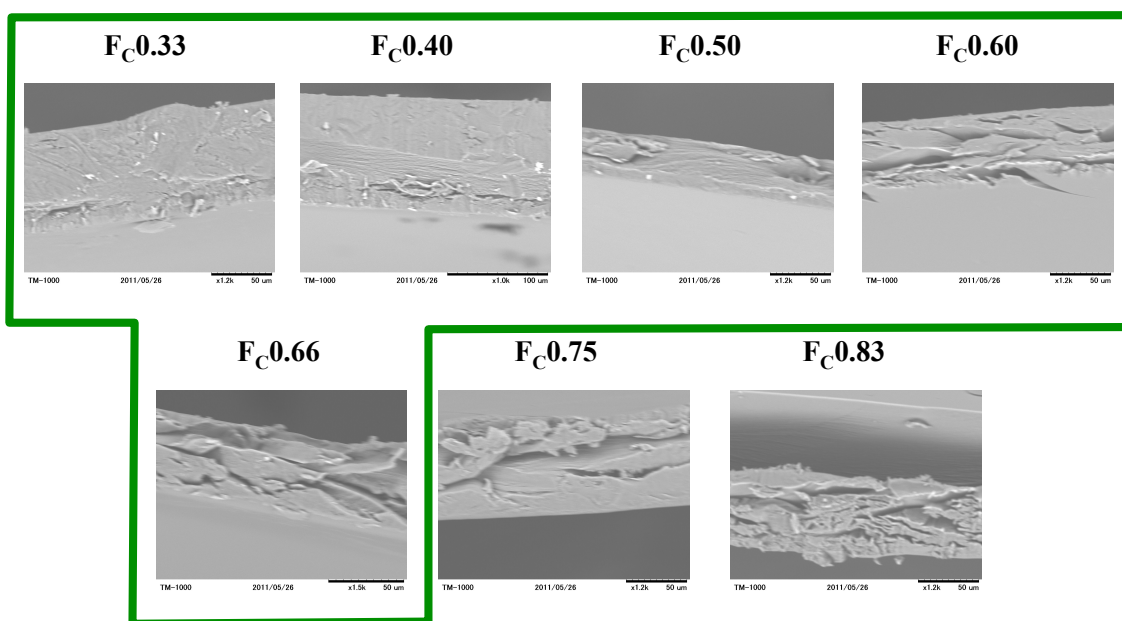


Figure 5-10 SEM images of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane.

#### 5.4 本章の結論

本章では、食品由来の生体高分子である  $\kappa$ -carrageenan と pullulan を複合させ、グルタルアルデヒドで架橋することにより、湿潤状態でも安定な自立複合膜の調製に成功した。製膜工程において、構造多糖類であるため、水酸基に富み、グルタルアルデヒドの架橋剤により膜を形成した後、塩化カリウムの添加によって、 $\kappa$ -carrageenan 分子鎖間架橋を形成させることが可能である。さらに熱処理によって化学的架橋工程を進行させ、65°Cという最適な加熱温度を見出された。

複合膜構造の制御因子としての  $\kappa$ -carrageenan の質量存在割合の増大に伴い、機械的強度は増大し、実用にできる強度を有する生体高分子膜が得られた。 $\kappa$ -carrageenan の質量存在割合  $F_C$  の増大に伴い質量含水率は増大した。本研究の複合膜は高い含水率をもたらした機械的強度の損失を克服し、含水率が高い状態で膜内の有効拡散係数が高く期待できるので、丈夫で物質透過に優れた複合膜である可能性がある。

## 第 6 章 濃度差を拡散推進力とする分子サイズ認識機能の評価

### 6.1 本章の背景および目的

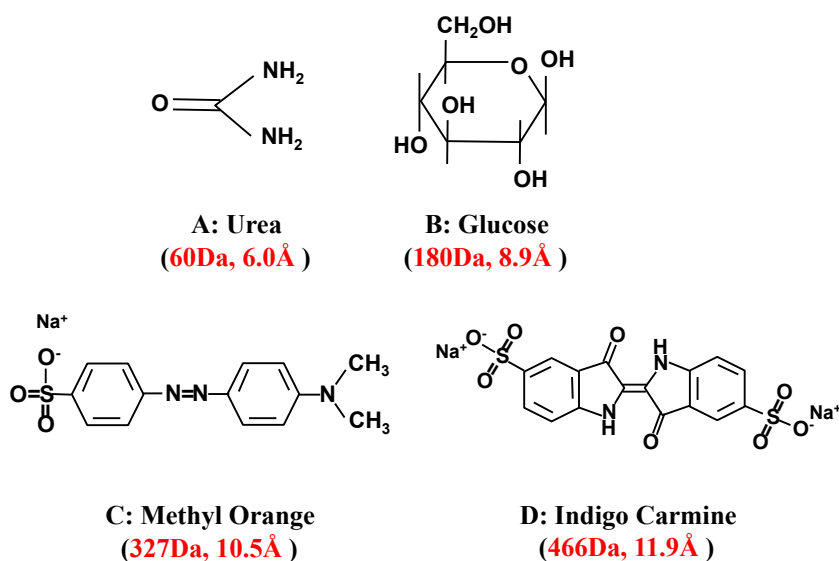
本章では、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜を利用した温和な条件下で行う分子拡散速度差を主に利用した分離方法として、それを可能にする取扱が簡便で組み立て再利用が可能な膜分離プロセスを提案する。濃度勾配を駆動力とした膜内の拡散は、膜の素材である高分子基質内に物質が溶解し、溶解後、膜内を拡散するいわゆる溶解拡散機構における物質移動である。膜内の物質透過チャンネルよりも小さな分子のみを選択的に透過する「分子ふるい」の作用が期待される。

膜を用いた分離プロセスの性能を特性づける分子の拡散係数は重要な物性値である。本章の目的は、膜を介した物質の拡散現象を利用し、特定の分子量範囲 60~1017Da における膜内の有効拡散係数を求め、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の透過選択性能を見出すことである。

### 6.2 実験系および解析方法

#### 6.2.1 指標物質の選定と分子サイズの決定法

膜内の拡散の評価は「3.2.1 物質透過実験の設計」に基づき物質透過実験を行った。膜の物質透過特性を評価する指標成分として、静電的・疎水的相互作用に中立の物質を選択した。本研究において、Urea (60Da)、Glucose (180Da)、Methyl Orange (327Da)、Indigo Carmine (466Da)、Bordeaux S (604Da)、Brilliant Blue (826Da)、Rose Bengal (1017Da)を選定した。指標物質の化学構造式を Figure 6-1 に示す。



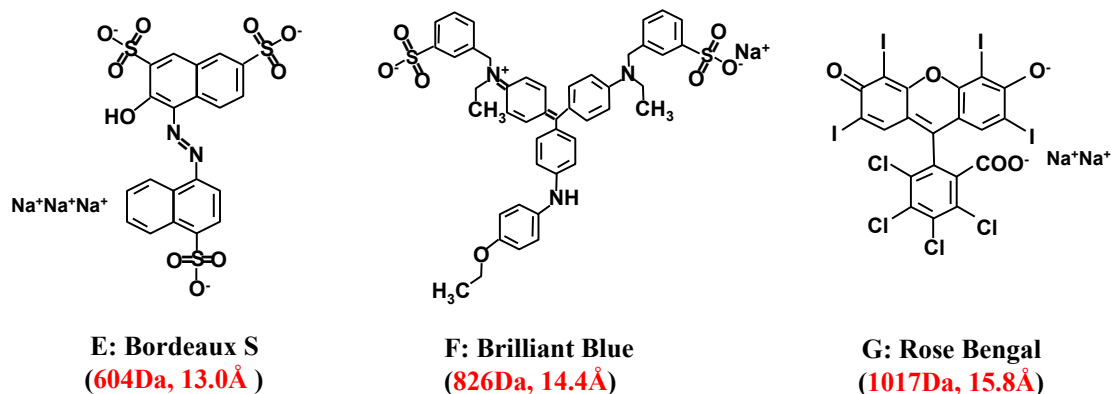


Figure 6-1 Chemical structure of model components as the indicator of molecular size.

Table 6-1 Marker molecules used to characterize ultrafiltration membranes

Species	Molecular weight [10 <sup>3</sup> Da]	Estimated molecular Diameter [Å]
Sucrose	0.34	11
Raffinose	0.59	13
Vitamin B12	1.36	17
Bacitracin	1.41	17
Insulin	5.70	27
Cytochrome c	13.4	38
Myoglobin	17.0	40
$\alpha$ -Chymotrysinogene	25.0	46
Pepsin	35.0	50
Ovallbumin	43.0	56
Bovine albumin	67.0	64
Aldolase	142	82
$\gamma$ -Globulin	150	84

Baker は、限外濾過膜に関する研究の為に、様々なモデル分子の分子量 MW[Da] と分子直径  $d$ [Å] の推算値を求めている。限外濾過膜実験において一般的に使用されている指標物質の分子量と分子直径を Table 6-1 に示す (Baker, 2004)。



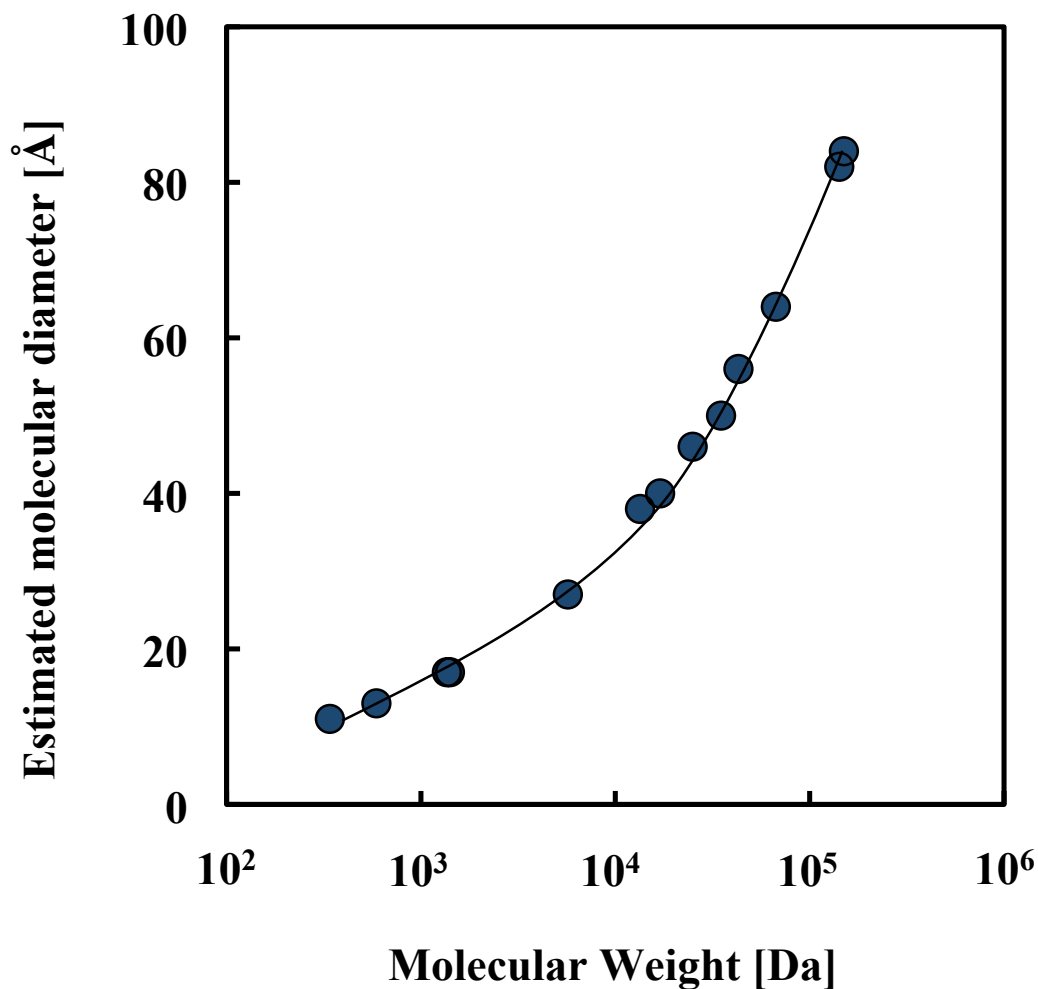


Figure 6-2 Effect of estimated molecular weight on molecular diameter referred from Baker, R. W. (2004).

上記の推算値を独自にプロットし (Figure 6-2)、分子量と分子直径の推算式(6-1)を導いた。ここは  $d$  の単位は[Å]である

$$d = 1.5056 \times MW^{0.3371} \tag{6-1}$$

この式を用いて本研究が選択した指標物質分子について、分子直径を推算した。

## 6.2.2 自由溶液中での拡散係数の推算式

高分子膜内のネットワークにおける有効拡散係数と比較する基礎として、純溶媒中での拡散係数を把握することは重要である。液体中における物質の拡散係数は、温度に比例し、粘度に逆比例するとした Stokes-Einstein の (式 6-2) 式が基本的な関係である

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu_B \gamma_A} \quad (6-2)$$

ここで、 $\mu_B$  は溶媒 B の粘度[Pa s]、 $\gamma_A$  は溶質 A の分子半径[m]である。また  $k_B$  ボルツマン定数 ( $1.38 \times 10^{-23} \text{JK}^{-1}$ ) である。溶質の濃度が十分低いときには、次のウィルキー-チャン (Wilke & Chang, 1955) の式が経験式として広く用いられる。

$$D = 1.86 \times 10^{-18} \frac{(\phi M_B)^{0.5} T}{\mu_B \nu_A^{0.6}} \quad (6-3)$$

ここで、 $M_B$  は溶媒 B の分子量 [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]、 $\nu_A$  は溶質 A の沸点における分子容 [ $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ ]、 $\phi$  は溶媒の会合を表す係数で、水に対しては 2.6、メタノール及びエタノールに対してはそれぞれ 1.6 及び 1.5、ベンゼンやヘキサンなどの非会合溶媒に対しては 1.0 となる。

## 6.3 実験結果および考察

### 6.3.1 有効拡散係数に対する指標物質の分子サイズの影響と評価

Figure 6-2 には各指標物質分子の膜内有効拡散係数  $D_{eff}$ 、並びに Wilke-Chang 推算式より算出した自由溶液系での拡散係数に対する分子量の影響を示す。 $Fc0.33$  の膜において Urea (60Da) から Rose Bengal (1017Da) にかけて、分子量わずか 17 倍の変化にも関わらず、膜内の有効拡散係数が 15,000 倍の変化を現した。当該分子量範囲において  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜は鋭敏な分子分画機能を有していることを初めて明らかにした。これは、本研究のオリジナルな知見である。また、有効拡散係数の変化曲線の変曲点により物質透過チャンネルは Methyl Orange の分子サイズ (約 11Å) に相当し、透過チャンネルのサイズは単

分散で約 11Å に集中して揃っていることが示唆された。

この有効拡散係数 15,000 倍の変化が示すものは、膜厚、膜面積、濃度勾配一定において単位時間当たりに物質移動するモル数物質移動速度  $N[\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}]$  が 15,000 倍であることを示している。すなわち、わずか約 0.33[mm]の膜を介することで、Rose Bengal 1分子が物質移動する時間で Urea 15,000 分子が物質移動することになり、60[Da]<MW<1017[Da]の分子量範囲内に存在する分子の物質移動における速度差を顕著に拡張することが可能である。この分子量範囲には必須アミノ酸、ポリフェノール、糖類、天然色素など、様々な機能性食品成分が存在しており、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の鋭敏な分子分画機能を利用した速度差分離によって機能性食品成分の分離・精製に応用することが期待できる。

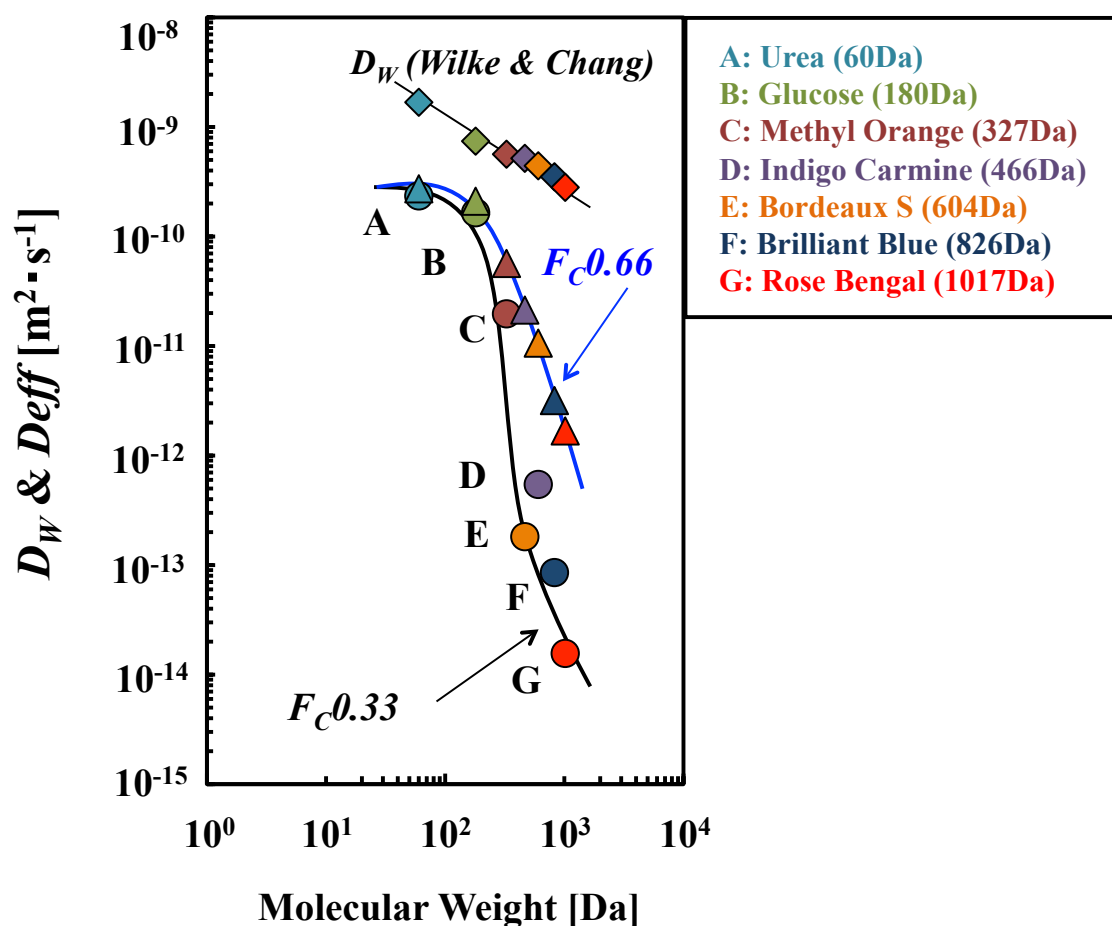


Figure 6-2 Effect of molecular weight on the effective diffusion coefficient of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane.

また、 $F_C$  が 0.66 の膜においては、比較的な大きな分子（Indigo Carmine ~ Rose Bengal）の有効拡散係数が大きくなった。このことは  $F_C$  の値が大きくなることによって、物質透過のチャンネルが大きく拡張され、当該分子量サイズの拡散が促進されたことを意味している。もとより小さい分子はチャンネルの拡張を受けないので、変化は微弱である。

### 6.3.2 $\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )の制御による分子分画性能の設計

Figure 6-2 より、 $\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )による糖鎖ネットワーク制御が膜内分子の拡散係数を支配している可能性を指摘することができたので、有効拡散係数に対する  $\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )の影響を改めて実測し、Figure 6-3 のように整理した。

Figure 6-3 (a) には 327Da から 1017Da の分子量範囲において、有効拡散係数は  $\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )増大に伴い、膜内の有効拡散係数は  $F_C$  の一次比例して増加する傾向を示した  $F_C$  と有効拡散係数の相関式を求めることができた (式 (6-4))。  $\alpha$  と  $\beta$  の値は Figure 6-3 から読み取り、Table 6-2 にまとめた。

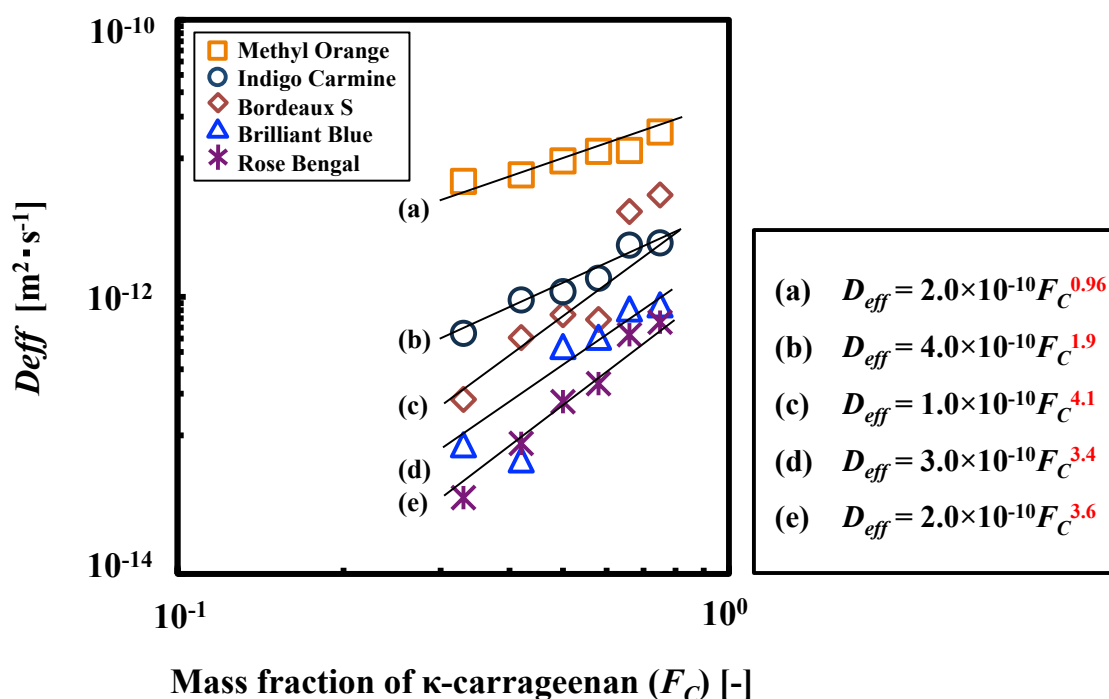


Figure 6-3 Effect of  $F_C$  values on the effective diffusion coefficient of the composite membrane.

$$D_{eff} = \alpha F_c^\beta \quad (6-4)$$

Table 6-2 The change of  $\alpha$  and  $\beta$  value by molecular size

Molecular size [Å]	$\alpha$ (Eq. (6-4))	$\beta$ (Eq. (6-4))
10.6	$2.0 \times 10^{-10}$	0.96
11.9	$4.0 \times 10^{-10}$	1.9
13.0	$1.0 \times 10^{-10}$	4.0
14.4	$3.0 \times 10^{-10}$	3.4
15.8	$2.0 \times 10^{-10}$	3.6

指数項と分子サイズの関係を知るために、Figure 6-4 をプロットし、指数項の  $\beta$  は分子サイズの 3.3 乗に比例した(式(3-17))。

$$\beta = 5.0 \times 10^{-4} MS^{3.3} \quad (6-5)$$

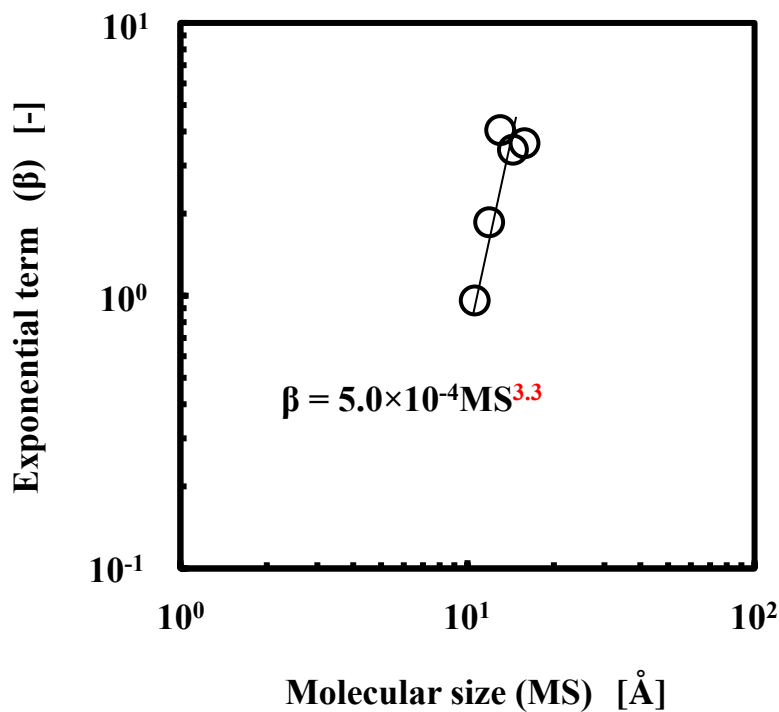


Figure 6-4 Dependence property based on the radicals of relational expressions that as mentioned on (Figure 6-3) and molecule sizes of dyes.

#### 6.4 本章の結論

$\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜による自立膜の分子分画機能とその有効な分子量範囲を明らかにするため、分子サイズ指標として Urea (60Da)、Glucose (180Da)、Methyl Orange (327Da)、Indigo Carmine (466Da)、Bordeaux S (604Da)、Brilliant Blue (826Da)、Rose Bengal (1017Da) を選択し、物質透過実験を行った。60Da から 1017Da の分子量範囲において、分子量の増分約 17 倍にも関わらず、膜内の有効拡散係数は 15,000 倍という顕著な変化を示し、複合膜は分子サイズを認識し、物質分離膜としての可能性が認められる。また、 $\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )を制御することにより、膜内のネットワーク構造が変化し、目的に応じた物質透過性能を設計できる可能性がある。

## 第7章 圧力差を推進力とする純水の透過性能の評価

### 7.1 本章の背景および目的

限外濾過法の応用は、溶質の分離・分画と溶液の濃縮とに大別される。前者では溶質の膜透過特性が重要となり、後者では、通常、溶質はほとんど膜を透過しないため、どのくらい大きな膜透過流束を維持できるかが重要となる。分離・分画に関する理論では、溶質の膜透過現象の定量的記述が性能評価にとって重要である。

本章では、圧力差を駆動力とする純水の透過速度を評価し、膜の基本特性を求めた。

### 7.2 実験系および解析法

#### 7.2.1 高分子膜の純水透過挙動

高分子膜内の純水透過機構を評価するには細孔を多数の円管の集合体としてモデル的に捉えることができる。円管内の流れるニュートン流体では円管長さ  $L$  が管径  $R_l$  を大きく上回る ( $L \gg R_l$ ) 円管内を流れる定常流において、体積流量  $Q[\text{m}^3 \text{s}^{-1}]$  と圧力損失  $\Delta P[\text{Pa}]$ 、粘度  $\mu[\text{Pa} \cdot \text{s}]$ 、半径  $R_l[\text{m}]$  の関係は Hagen-Poiseuille の式で記述できる。

$$Q = \frac{\pi R_l^4}{8\mu} \cdot \frac{\Delta P}{L} \quad (7-1)$$

式 (7-1) が成立するのは流体が層流であるときで、流速が増加し乱流に成長すると付加的なエネルギー損失が発生するため式 (7-2) は成立しない。一方、精密ふるいの孔やオリフィスなど流路が短く  $L \ll R_l$  であるとき、流量  $Q$  の関係式は次式で表される。

$$Q = \frac{\pi R_l^2}{3\mu} \cdot \Delta P \quad (7-2)$$

また、Dagan らは半径  $R_l$  と同程度の長さ  $L$  の短い流路 ( $L=R_l$ ) の場合について検討し、流量  $Q$  に関する次の関係式を提出した。

$$Q = \frac{R_1^3 \Delta P}{3\mu} \left( 1 + \frac{8L}{3\pi R_1} \right)^{-1} \quad (7-3)$$

以上のように、管径に対する流路の長さにより、管内を流れる定常流は異なる挙動を示す。ただし、一般的限外濾過膜は  $L \gg R_1$  であり、直線的に貫通した細孔を持つ高分子膜を仮定し、膜内の純水透過挙動は Hagen-Poiseuille 式で記述することが多い。

### 7.3 実験結果および解析法

#### 7.3 実験結果および考察

##### 7.3.1 経時変化

Figure 7-1 に  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜を用いた純水透過における経時変化を示した。透過時間の経過にしたがって、純水の透過量は時間の一次比例して増加する傾向を示した。相関線の勾配より、透過流束を算出することができる。なお、体積流束に換算するため、Figure 7-1 より求められた質量流束をその温度における水の密度で除した。

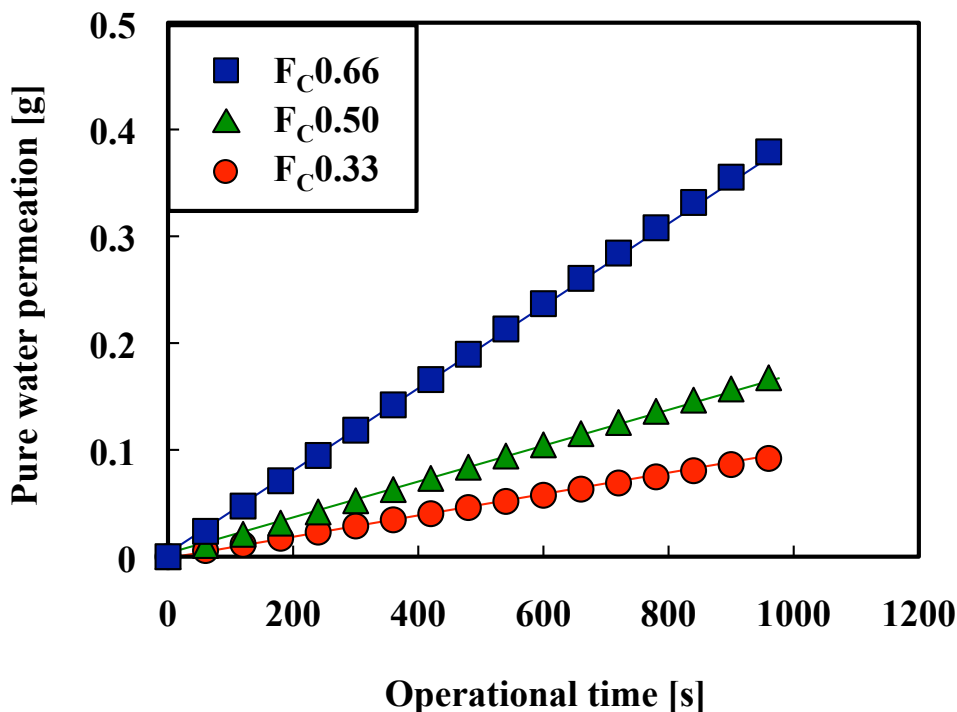


Figure 7-1 The permeability of pure water on  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane (GA70mM, KCl0.7M) in process of time. (298K, 100kPa).



### 7.3.2 圧力依存性

透過流束と操作圧力の相関を Figure 7-2 に示した。操作圧力に対して透過体積流束  $J_V$  は体積流量  $Q$  を膜面積と膜厚さで除した値である。操作圧力の一次に比例し、Hagen-Poiseuille 式に従っていることが示唆された。 $\kappa$ -carrageenan の含有量の高い複合膜ほど同じ圧力に対して、高い透過流束を示した。これは先に示した拡散係数の変化でも見られたように  $F_C$  の増大による透過チャンネルの拡張を示唆している。

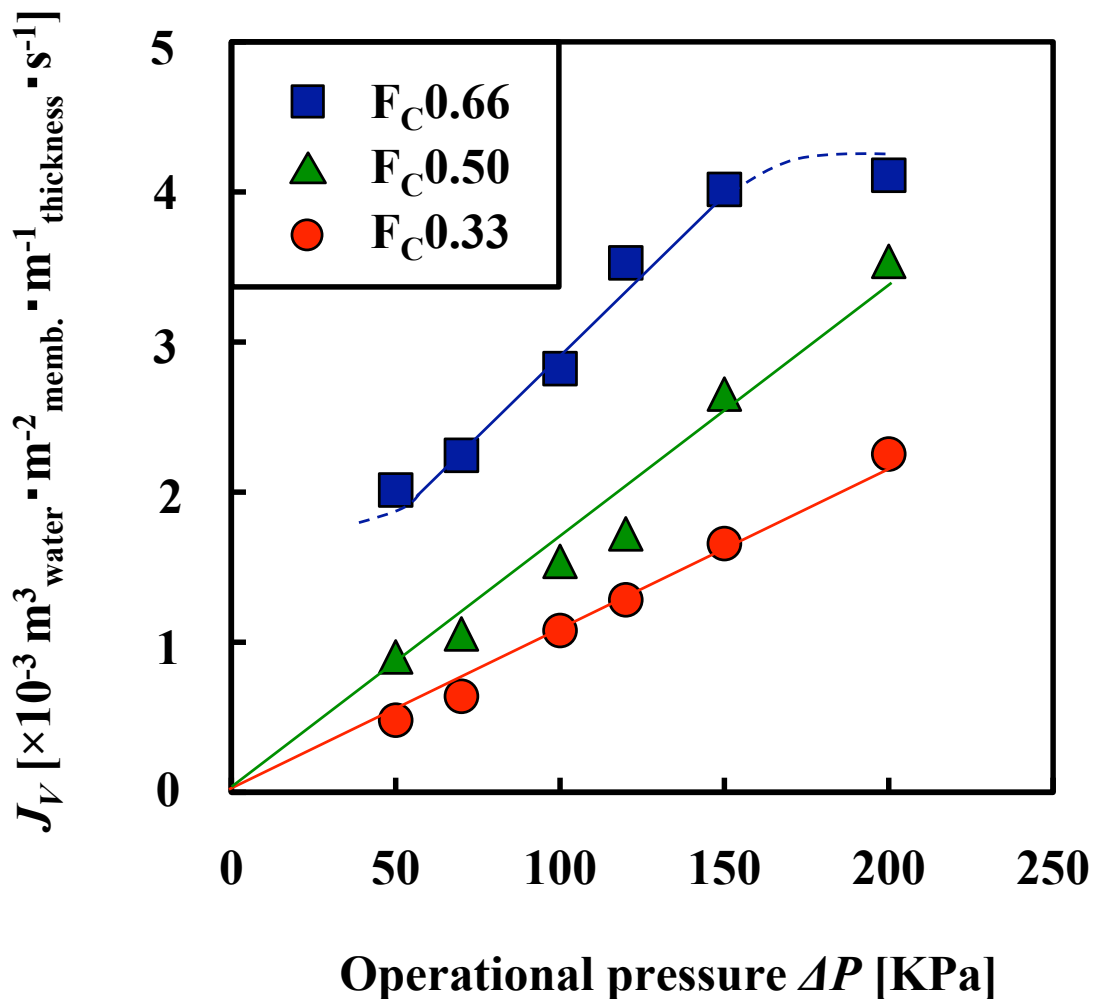


Figure 7-2 Pure water permeability of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membranes (GA 70mM, KCl 0.7M) prepared from different mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ) by applying different pressures.

なお、 $F_C$  の大きな膜（特に  $F_C 0.66$ ）流束の圧力依存性は小さな膜の依存性とや

や異なる。透過経路の迷宮度など構造上の特徴が変化していることを示している。

### 7.3.3 温度依存性

Figure 7-3 に、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜における、純水透過流束の温度依存性を示す。温度上昇とともに透過流束は増大し、20°Cと比べて30°Cでは、 $F_C0.33$  膜の場合は約 1.5 倍、 $F_C0.66$  膜の場合は約 2 倍程度の値を示した。温度を上昇させることによって水の粘度が低下するとともに、高分子の膨張によって複合膜内の架橋構造の変化が生じ、透過空間の立体構造が変化したと考えられる。なお、 $F_C$  の大きい膜の方が温度の影響を大きく受ける点が興味深い。高分子膜の架橋構造の違いを読み取ることができる。

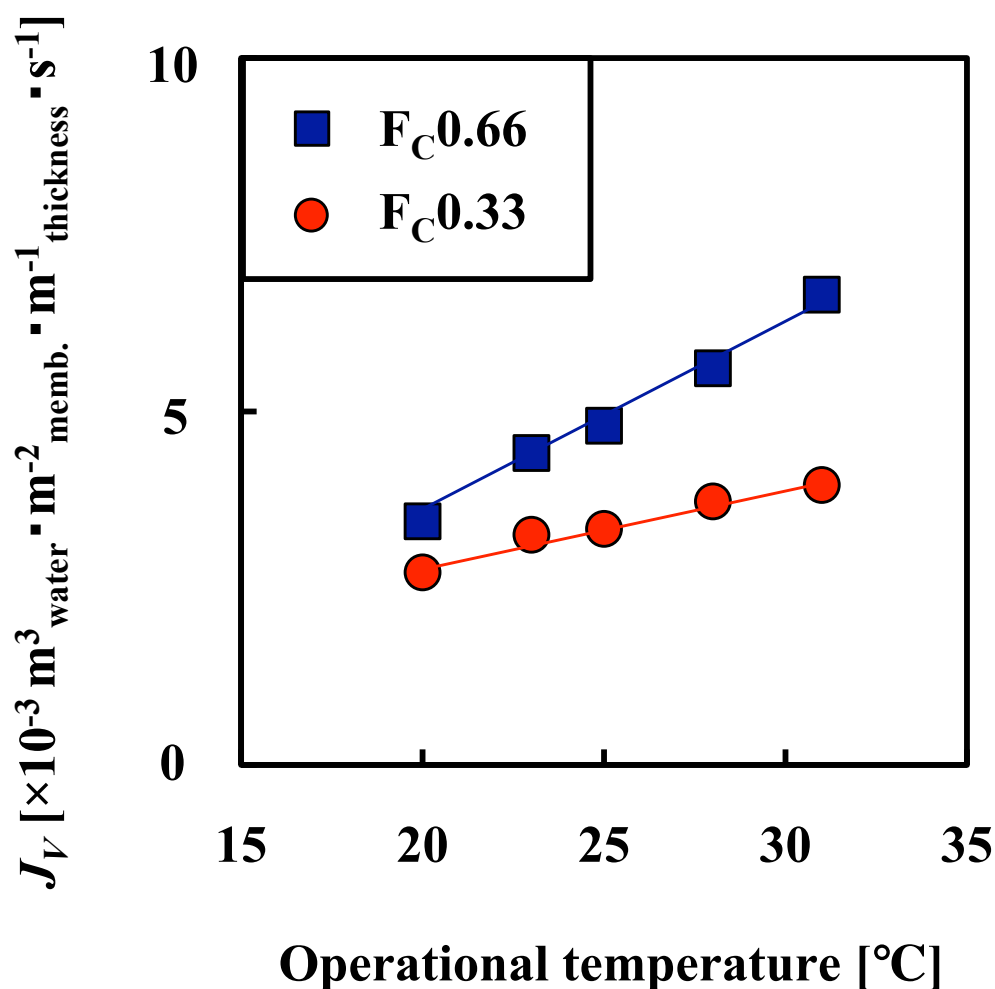


Figure 7-3 Temperature dependence of pure water permeability.

### 7.3.4 透過溶液の粘度依存性

透過流速と透過溶液の粘度の相関を Figure 7-4 に示す。透過溶液の粘度はグルコース水溶液の濃度を変化させることによって調製した。κ-carrageenan/pullulan 複合膜の純水透過流束は粘度の増大に従って減少した。Hagen-Poiseuille 式によれば、透過流束と透過溶液の粘度は反比例するが、実測された結果は必ずしもそうではない。F<sub>c</sub> によってもその傾向に差異があり、透過機構が必ずしも単純な Hagen-Poiseuille のモデルに従うものではないことを示している。

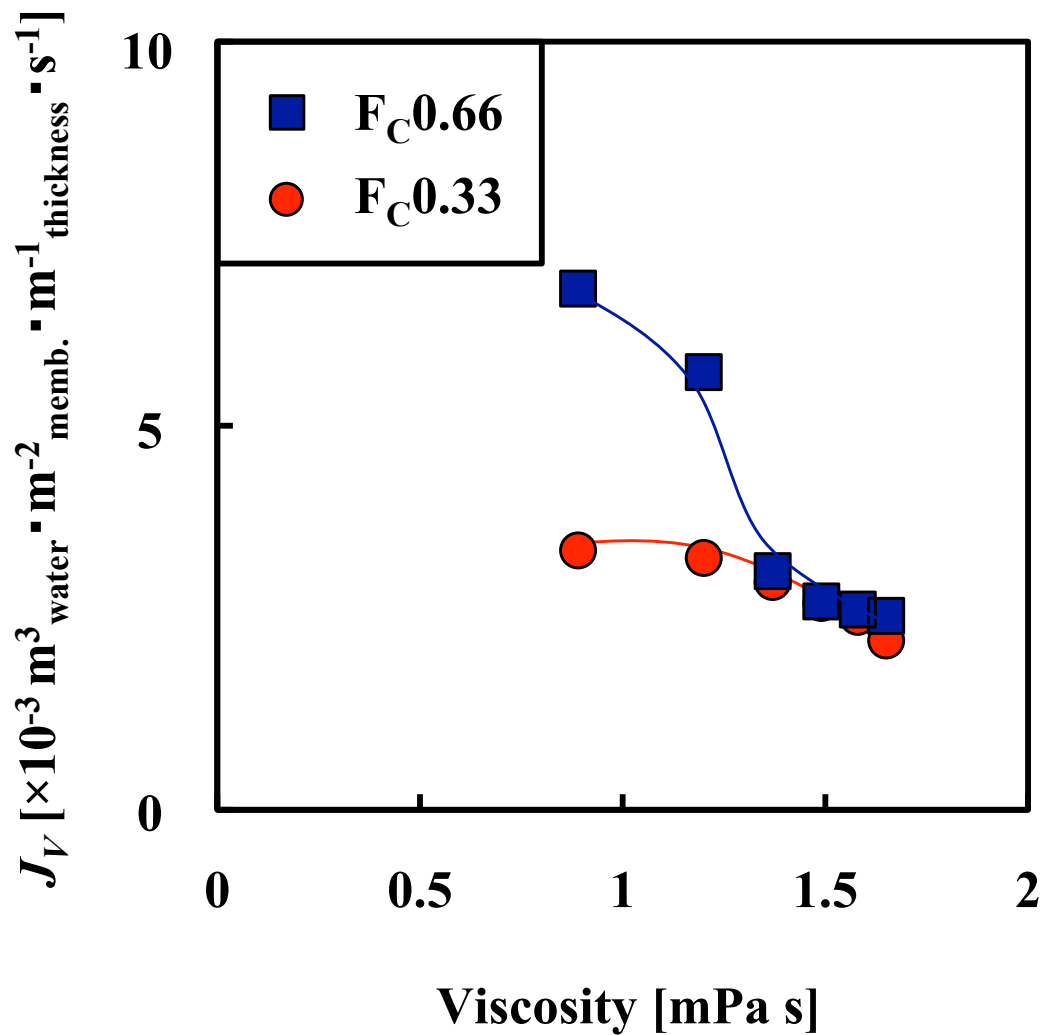


Figure 7-4 Effect of the feed solution viscosity on the pure water permeability (100kPa, 298K). Viscosity was regulated by glucose concentration.

### 7.3.5 $\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )の影響

Figure 7-5 に、複合膜の含水率と純水透過速度に対する  $\kappa$ -carrageenan 存在割合 ( $F_C$ )の影響を示す。 $F_C$ の増大とともに含水率と純水透過速度が増大した。一般的に、含水率の高い高分子膜のほうが水透過速度は高い。 $\kappa$ -carrageenan 高分子内の硫酸基の親水性が高いため、 $F_C$ の高い膜ほど純水透過流速が高い。

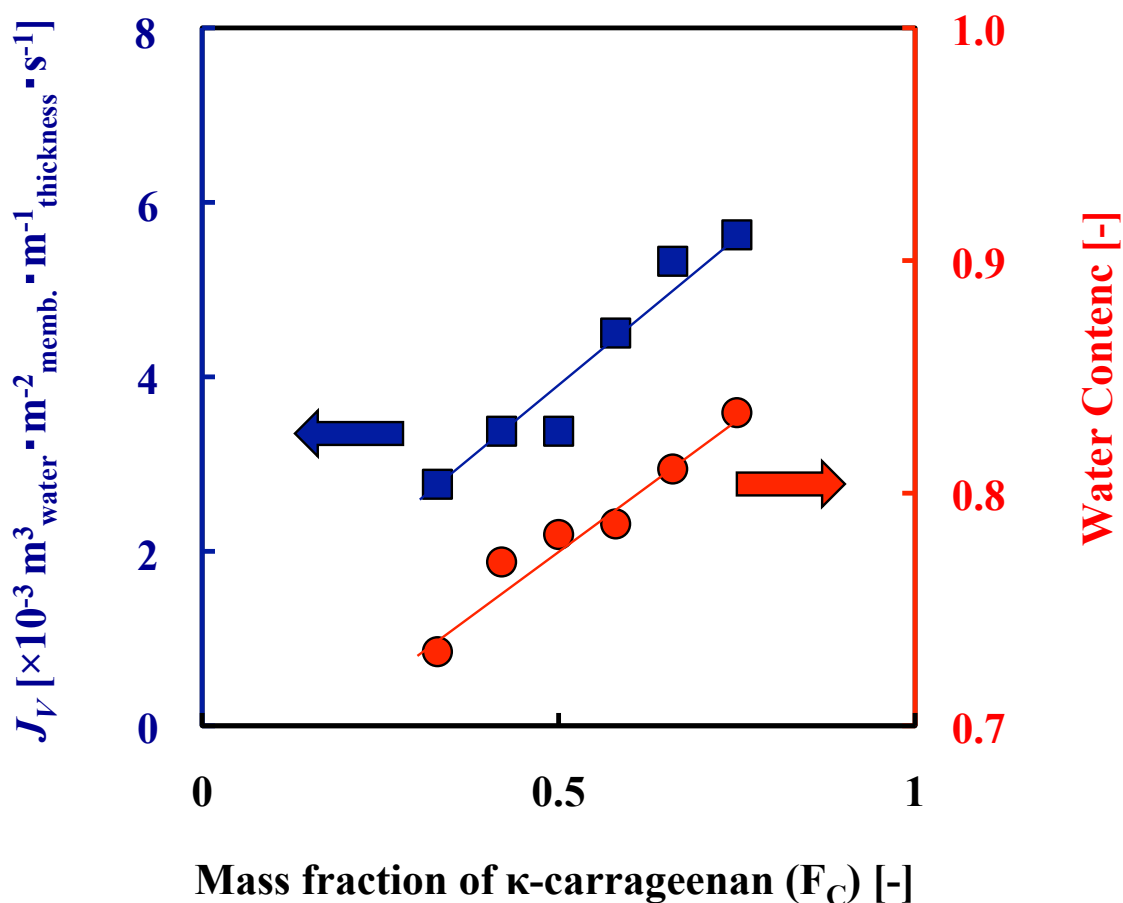


Figure 7-5 Change of the water permeated flux (150kPa, 298K) and the water content of the membrane with regulated  $F_C$  values.

### 7.4 本章の結論

本章では、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の純水透過特性を評価するを目的として、透過流束  $J_V$  に対する操作時間  $t$ 、操作圧力  $\Delta P$ 、透過溶液温度  $T$ 、透過溶液粘度  $\mu$  の依存性について検討を行った。膜内の純水透過機構は、基本的には圧力の一次に比例する Hagen-Poiseuille 流れとしてモデル的に捉えられることを示した。

$\kappa$ -carrageenan の存在割合( $F_C$ )の変化は純水の透過流束に大きな影響を与えた。高分子網目構造の形成にとって  $F_C$  が支配的役割を果たしていることが明らかになった。

## 第 8 章 水溶性色素に対する分離特性

### 8.1 本章の背景および目的

生物難分解性の色素物質の除去あるいは分離手段として、膜分離は一つの有効な方法である。膜分離法により、食品工業の廃液に含まれる色素を分離して廃液の色度軽減が図れるとともに、色素分子を機能性素材として取り出すことも可能になると考えられる。生体高分子の多くに見られる構造多糖類は糖分子鎖内に多数の水酸基、アミノ基、カルボキシル基を有しており、これらの官能基は化学修飾が容易である。このため、化学的機能を付加するのに有利な膜素材である。また、生分解性を有しているため、使用後の環境負荷は小さい。

本章の目的は糖鎖ネットワークの指標として  $\kappa$ -carrageenan 存在割合 ( $F_C$ ) に注目し、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜によって分子サイズの異なる色素成分の選択的分離の可能性を求めることである。なお、モデル色素として Methyl Orange (327Da)、Indigo Carmine (466Da)、Bordeaux S (604Da)、Brilliant Blue (826Da)、Rose Bengal (1017Da) (Figure 8-1)を選定した。

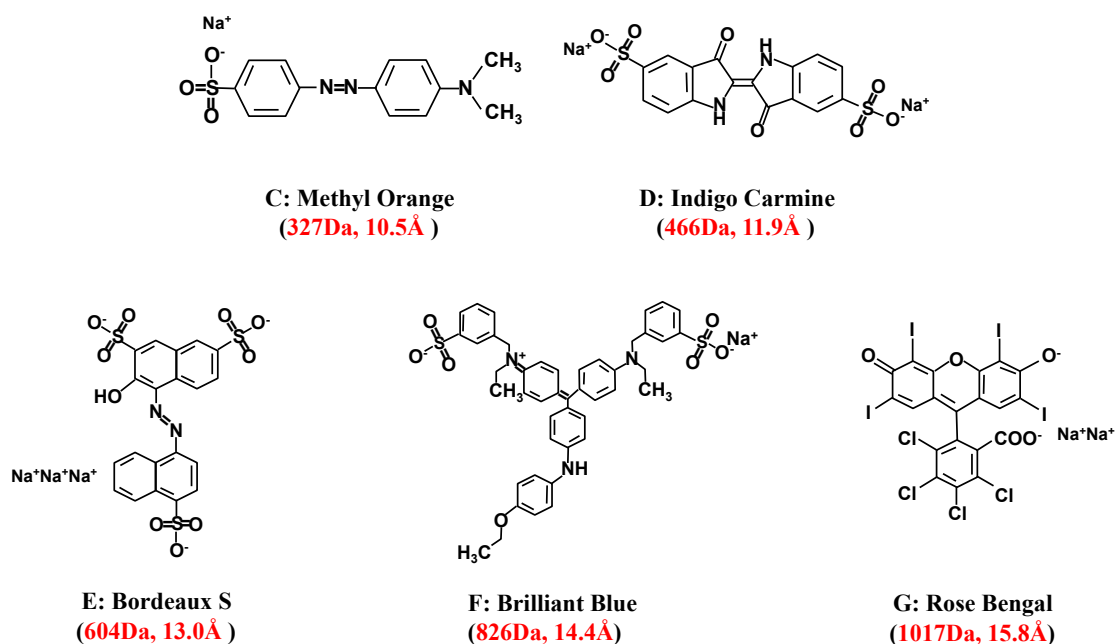


Figure 8-1 The chemical structures of dye component.

## 8.2 実験系および解析方法

### 8.2.1 色素溶液の分析方法

本研究で用いたモデル色素分子は全て親水性であり、水を溶媒として溶解した。定量方法としては、サンプルを採取後、予め測定した最大吸収波長にて紫外・可視分光光度計 (UV Mini 1240, Shimizu, Kyoto, Japan) を用いて吸光度を測定した。pH は試料水をマグネチックスターラーで攪拌しながら、pH メーター (HORIBA D-50 シリーズ, Kyoto, Japan) で測定した (Table 8-1)。

Table 8-1 The dye components

Marker component	Molecular Weight [Da]	Molecular Size [Å]	pH <sup>a</sup>	Structural Formula
Methyl Orange (MO)	327	10.6	5.6	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>9</sub> O <sub>9</sub> SNa
Indigo Carmine (IC)	466	11.9	5.4	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>
Bordeaux S (BS)	604	13.0	5.9	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub>
Brilliant Blue (BB)	826	14.4	5.5	C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>
Rose Bengal (RB)	1017	15.8	5.8	C <sub>20</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> I <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>5</sub>

<sup>a</sup> Determined from the marker component aqueous solutions of concentration at 1mM.

### 8.2.2 透過実験の概要と方法

限外濾過装置(第2章)に膜を装着し、予め調製された色素溶液 190ml を限外濾過セルに入れ、膜表面から約 1cm 離れる攪拌子で、限外濾過装置下部よりマグネチックスターラーを用いて回転攪拌した。限外濾過装置上部に窒素ガス配管を接続し、所定圧力 150KPa まで加圧することにより、液を透過させた。透過流速は、透過液の質量を時間毎に電子天秤で秤量することにより算出した。なお、2.2.5 に紹介したように、膜の下と支持板の間に純水で濡れた濾紙 (ADVANTEC No.2) を介しているため、透過する溶液に直ちに希釈される可能性があるため、出始めの約 4ml は捨て、その後透過する液を透過液とした。

また、膜の色素溶液の透過流束は第 2 章の方法に従って測定し、阻止率については、測定可能な溶液濃度が原液および透過液の濃度であることから、一般に (8-1)式で定義される見掛けの阻止率  $R_{obs}$  を用いた。

$$R_{obs} = \frac{C_f - C_p}{C_f} \quad (8-1)$$

$C_f$ と  $C_p$ は、それぞれ原液および透過液の濃度である。透過が進むと、一般に膜面の溶質濃度は原液本体の濃度よりも高くなる。これを濃度分極と呼ぶ。膜は、実際に膜面濃度  $C_m$ の溶質を排除していることになる。したがって、真の阻止率  $R_{int}$ は式(8-2)で定義される。

$$R_{int} = \frac{C_m - C_p}{C_m} \quad (8-2)$$

この  $C_m$ は実測できないので、本研究は見掛けの阻止率  $R_{obs}$ を複合膜の分離性能の指標として評価した。

### 8.3 実験結果および考察

#### 8.3.1 分子サイズに対する透過流速の影響

Figure 8-2 に、複合膜における透過流束と色素種類の関係を示す。 $\kappa$ -carrageenan 質量存在割合の高い  $F_c0.66$  膜において、透過色素の分子量が増大することによって、溶媒である水の透過流束が若干低下する傾向が現れた。 $F_c0.33$  の膜は透過流束は低下したが、全体として flux は一定である。これは膜面並びに透過チャンネル内への色素の蓄積が  $F_c$ の大きい膜においては顕著に現れた、 $F_c$ の小さい膜では色素の蓄積が少なく、流束が安定していると考えられる。なお、膜面は実験によって一旦は染色されるが、水洗すると無色透明になるので、色素の不可逆的吸着はみられない。



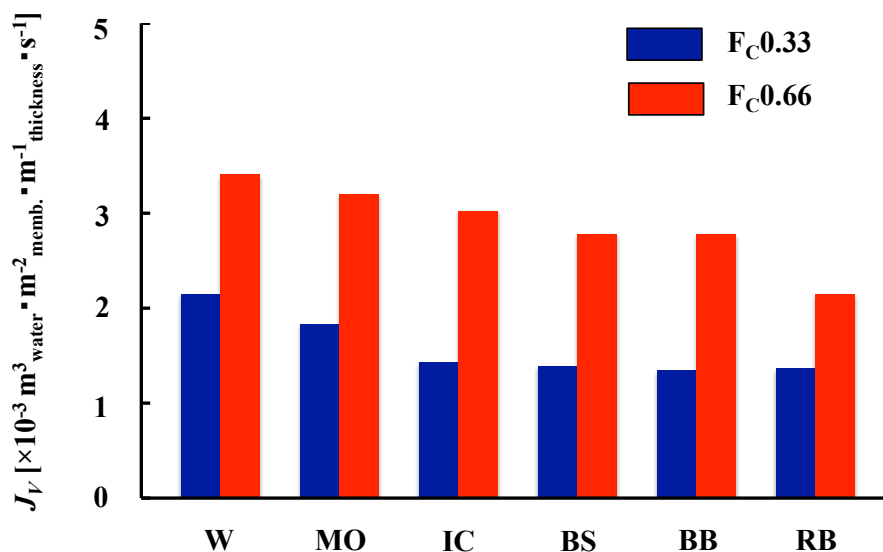


Figure 8-2 Membrane flux permeation of various model dye solutions (pressure: 200KPa). (W: Water; MO: Methyl Orange; IC: Indigo Carmine; BS: Bordeaux S; BB: Brilliant Blue; RB: Rose Bengal)

上記の結果をモデル図で示したものは Figure 8-3 である。色素分子は高分子膜内に自由水が存在するブロックに拡散し、濃度勾配に従って膜を拡散する。第 6 章で既に説明したように、指標物質の分子サイズと膜内の有効拡散係数に比例関係が存在したことから、分子が自分のサイズに相応しい物質透過チャンネルを探りながら膜を拡散して行く。従って、大きな分子群は小さな分子より膜内のネットワークを透過する時間が長いかもしれない拡散できないこともあるため、透過流束が小さくなる。

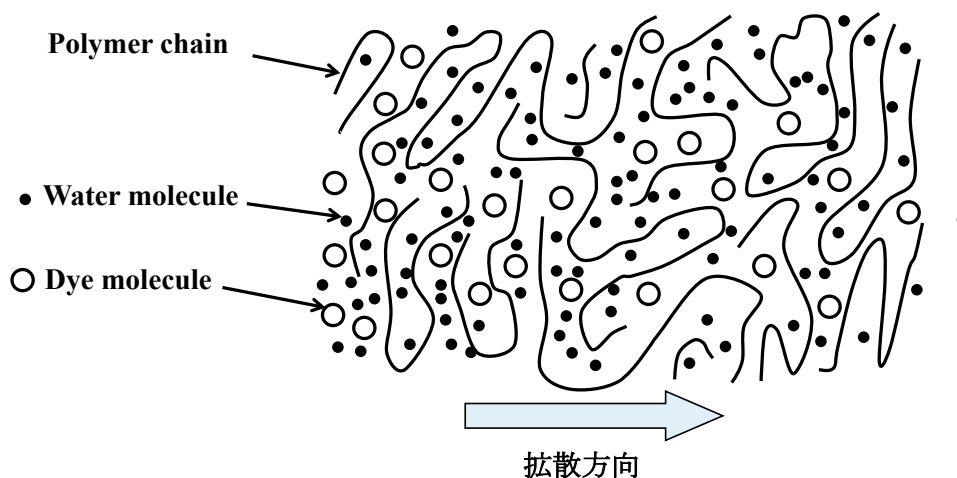


Figure 8-3 Model of the dye molecule diffuses through the void of polymer chains.

### 8.3.2 複合膜の分画分子量の測定

膜を用いて高分子と低分子を分離する場合、使用する膜には目的の高分子を阻止し、低分子を透過させる性能が求められる。この性能を示すのが膜の分画特性である。一般的には膜の性能評価として、見かけの阻止率 90%になる分子量をその膜の分画分子量 (molecular weight cut off) と呼ぶ。実際にはその分子量で画一的に分離できるわけではなく、ある分子量範囲を含んでいる。このように、生体高分子膜の分画分子量は大変重要な性能であり、実際に使用する目的にあわせて膜を選択する重要な目安になる。

Figure 8-3 には  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の分画分子量曲線を描いている。供試された分子量の増大とともに、阻止率が増大した。 $F_c0.3$  膜においては Methyl Orange (327Da) に対し、阻止率は 90%に達した。 $F_c0.66$  膜においては Indigo Carmine (466Da) に対し、阻止率は 90%となり、 $F_c0.33$  膜の分画分子量は 327Da であり、 $F_c0.66$  膜の分画分子量は 466Da と認めることができる。 $F_c$  の値が 0.33 から 0.66 に変化することによって、膜内の物質透過チャンネル平均サイズは Methyl Orange の分子サイズ(約 11Å)から Indigo Carmine の分子サイズ(約 12Å)に変化したことが示唆された。

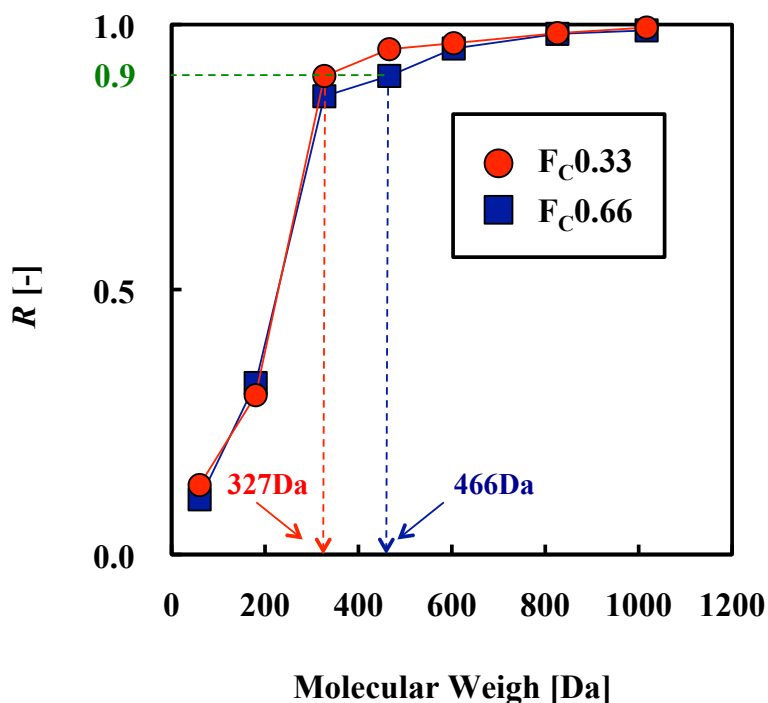


Figure 8-3 The selective curve of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane for dye molecules.

Figure 8-4 に  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜を用いた水処理前後の色調変化を示す。肉眼で透過前（記号 In）と透過後（記号 Out）の水相の色調変化は、色素分子の透過性能の差異を顕著に示している。特に、Indigo Carmine に対する透過選択性が FC0.33 の膜で明白に現れており、緻密な透過経路による分子サイズ認識能力がよく現れている。Indigo Carmine に対する脱色性が異なることによって、 $F_C$  の値が膜内のネットワークの変化を 支配することが分かった。

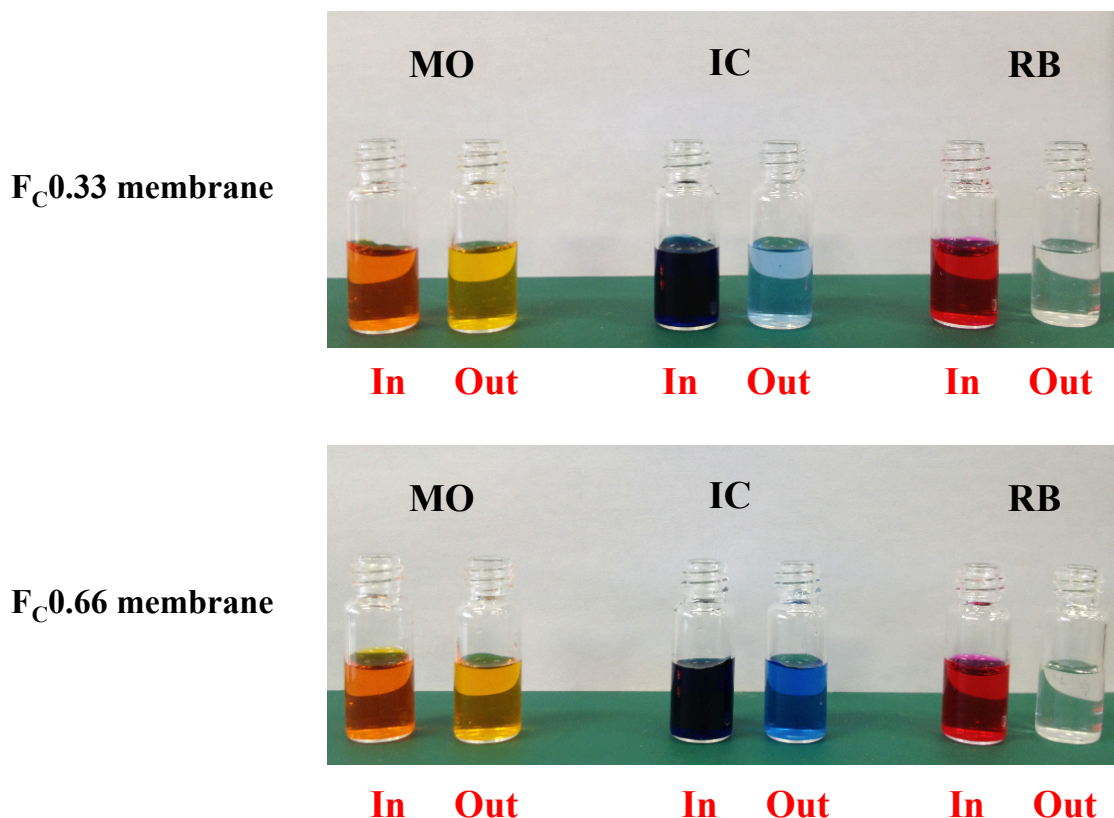


Figure 8-4 Comparison of the membrane performance in decolorization (In and Out represent the feed solution and the permeate solution, respectively.) The dyes were used Methyl Orange (MO), Indigo Carmine (IC), and Rose Bengal (RB).

#### 8.4 本章の結論

本章では、分子量変域 327Da から 1017Da まで色素を分離対象とし、 $F_C$ 0.33 と  $F_C$ 0.66 二種類の膜を用いて膜分離法による色素成分の分離技術について検討を行った。

- ①  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜は溶媒の高い透過流束を維持しつつ、色素分子のサイズに応じた選択分離に成功した。特に Rose Bengal (1017Da) に対し、

ほぼ 100%のみかけ阻止率を達した。

- ② 分画分子量曲線により、Fc0.33 膜の分画分子量は 327Da であり、Fc0.66 膜の分画分子量は 466Da であることが確認できた。
- ③  $\kappa$ -carrageenan の質量存在割合が 0.33 から 0.66 に変化することによって、膜内の物質透過チャンネル平均サイズは Methyl Orange から Indigo Carmine の分子サイズに変化したことが示唆された。
- ④ Fc の値が異なる膜によって色素分子の透過性能が異なることから、 $\kappa$ -carrageenan の存在割合は透過経路の形成に支配的役割を演じており、膜の分子分画性能を制御する有力な因子として認めることができた。

### 第9章 生体高分子膜の特性に活かした膜分離プロセスの提案

#### 9.1 本章の背景および目的

生物の有する機能を様々な角度から応用して有用物質を生産しようとする技術が近年著しく発達している。反応装置から取り出される反応生成物には、目的生成物のほかに未反応の原料物質、栄養源となる物質、pH調節のための副生物質など種々の物質が存在する。これらの混合物から目的生産物あるいはその他の物質を分離することはバイオ生産プロセスにおいて重要である。

多くのバイオ生産物は大量の水の中に希薄濃度でかつ多成分系として存在している。そのため、バイオ系生産物の分離は一般的な化学反応の生成物分離と異なる特徴を有する。それらを整理する。

##### ① 原料中の濃度が低い。

多くのバイオ系有用物質の生産に見られることであるが、mmol/L程度は一般的であり、場合によっては $\mu\text{mol/L}$ 程度のものを取り扱うことも少なくない。

##### ② 原料中には多くの物質が共存する

バイオ系生産物は生体中で多くの種類の生化学物質と共存していることを考えれば、この特徴は常に存在する問題である。しかも、多くの場合には目的物質の濃度が共存物質の濃度よりもかなり低い。

##### ③ 製品の純度の高いことが要求される

製品中に特に有害物質(バイオバード)を含まないことが必要である。なお、製品はその品質(生理活性)保持のため止むを得ず緩衝溶液中に添加した形、あるいは安定化剤を混合した形で供給される場合も多く、ここでいう純度とは不要の不純物を含まないという意味に解すべきである。この点は製品の安全性という観点から非常に重要である。

##### ④ 分離の条件は温和であることが望ましい

極度なpHや高温の条件では生化学物質が不可逆的に変性して活性を失ったり特性が変わることがあるので、できるだけ物理化学的に温和な条件下で分離を行い、不可逆的な変成を防ぐ必要がある。

バイオ系生産物の分離は高選択性と高濃縮性を要求されることが多く、このため、分離目的に適合した手法を組み合わせる使用することが必要である。その中であって、膜分離技術(Membrane Separation Technology)は食品や医薬品の

分野で濃縮・精製の工学的な手法として幅広く利用されている。その理由は物質分離において、蒸発などの熱的なプロセスを経過しないため、熱的に不安定なバイオ系物質の分離精製に用いることが可能である。また、溶媒を新たに用いる必要がないので、注目成分の純度が直ちに高められることになる。

既に述べたように、多くのバイオ生産物は大量の水の中に希薄濃度でかつ多成分系として存在している。このような系においては分離操作は単一の操作を一段で行うような単純なプロセスでは達成できない。この点に関しては、他の分離操作と協力して膜分離操作を多段的にかつ連続的に組み合わせることにより、注目成分の段階的分離精製が実現できる。

本章の目的は、第 2 章から第 8 章までの一連の研究成果を総合的に評価し、各章に記した膜の特長を活かして膜分離プロセスを提案することである。その基本方針として、食品由来の生体高分子の複合化と化学修飾により、糖鎖ネットワークの制御を実現し、注目成分の特性に応じた分離操作の上流側 (Up Stream) と下流側 (Down Stream) をそれぞれ担当する高分子膜を多段的かつ連続的な分離プロセスを提案することである。

## 9.2 本研究の表面改質 chitosan 膜と複合膜による多段膜分離プロセス

食品由来の生体高分子膜を用いた多段膜分離プロセスのモデル系としてタンパク質、単糖、尿素の三成分系を考えてみよう。まず、大きな分子量の分子の代用として例えばタンパク質 (Lysozyme or BSA) を上流側に設置する表面改質 chitosan 膜によって捕獲する。一般にタンパク質は回転楕円体の形状であり、その中心付近にくぼみ (キャビティ) があり、アフィニティーを示す活性点となっている。タンパク質と特異的親和性のあるリガント (本研究では Cibacron Blue F3GA) を chitosan 膜に導入し、より効率よくタンパク質を捕獲できる。次に、中程度の分子群の代表としてグルコース (単糖) を  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜によって分離し、最終的に小さな分子の代表として尿素が膜の透過液として回収される。

Figure 9-1 には chitosan 膜の各成分の有効拡散係数と  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の有効拡散係数を比較したものである。Chitosan 膜の有効拡散係数は  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の有効拡散係数より大きく、物質が速やかに透過することが分かった。従って、大きな分子を捕獲することは主な目的として、chitosan 膜を分離操作の上流側で利用し、次いで、下流側で  $\kappa$ -carrageenan/pullulan

複合膜の鋭敏な分子分画性能によって物質を分離することが合理的なプロセス設計である。

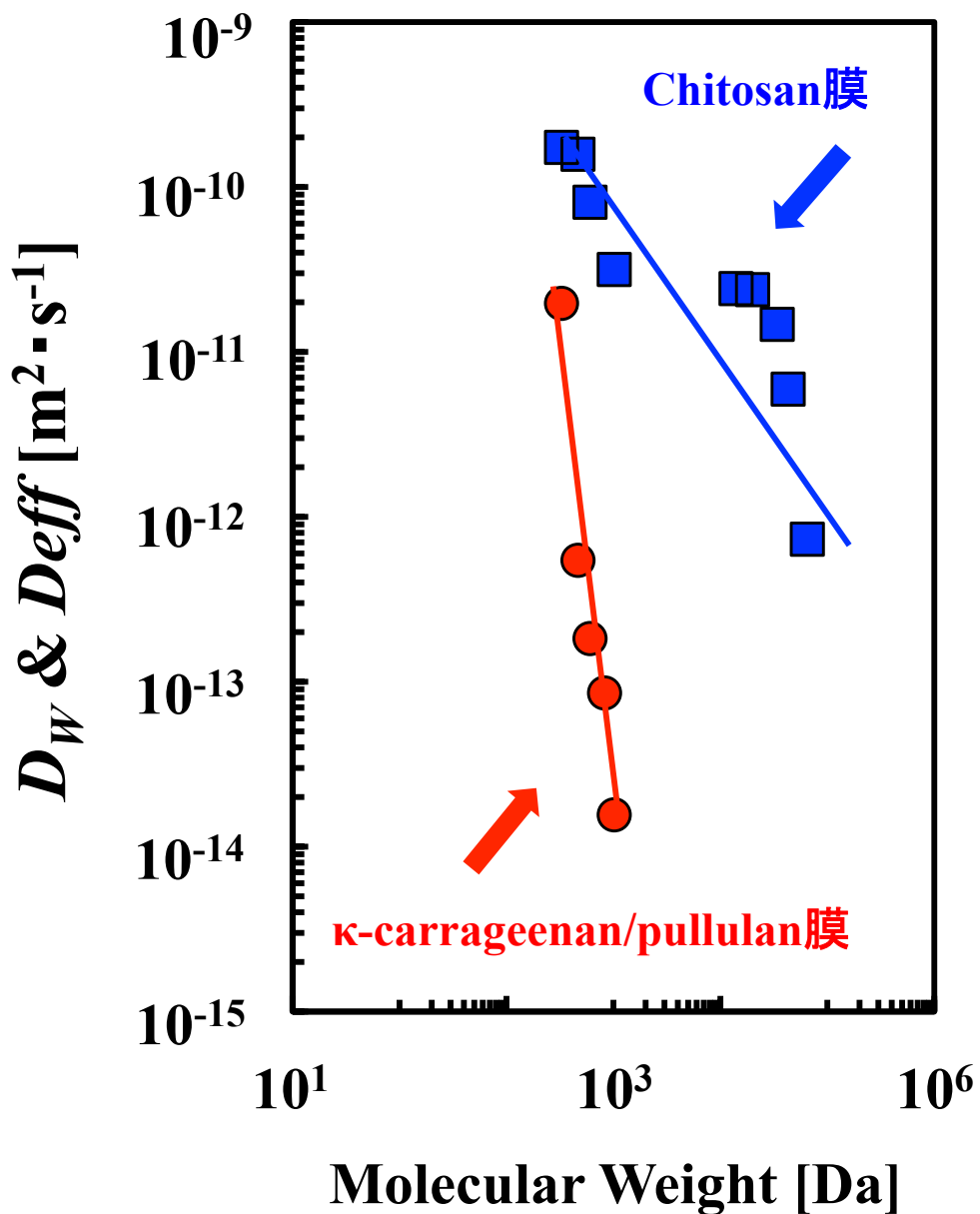


Figure 9-1 Effect of molecular weight on the effective diffusion coefficient of the membrane.

Figure 9-2 には、chitosan 膜での分離の一例として大きな分子の代表として、

Lysozyme、中程度の分子の代表としてグルコース、小さな分子の代表として尿素を取り上げた。図から明らかのように、Lysozyme は chitosan 膜上に留まり、濃度の減少は見られなかった。グルコースは膜を徐々に透過し、濃度が緩やかに減少した。さらに、尿素は最も小さい分子として膜を迅速に透過し、速やかに濃度減少が見られる。ここで、同じ時間における各成分の濃度をみると、20分後の例では、Lysozyme の濃度は変化無く、グルコースは約 50% の濃度減少を示し、尿素の 85% は同じ時間に膜を透過している。膜による速度差分離が明らかに現れた結果と言える。上流側の chitosan 膜を透過したグルコースと尿素はその下流側に設置された  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の鋭敏な分子分画機能によって分離することが可能になる。

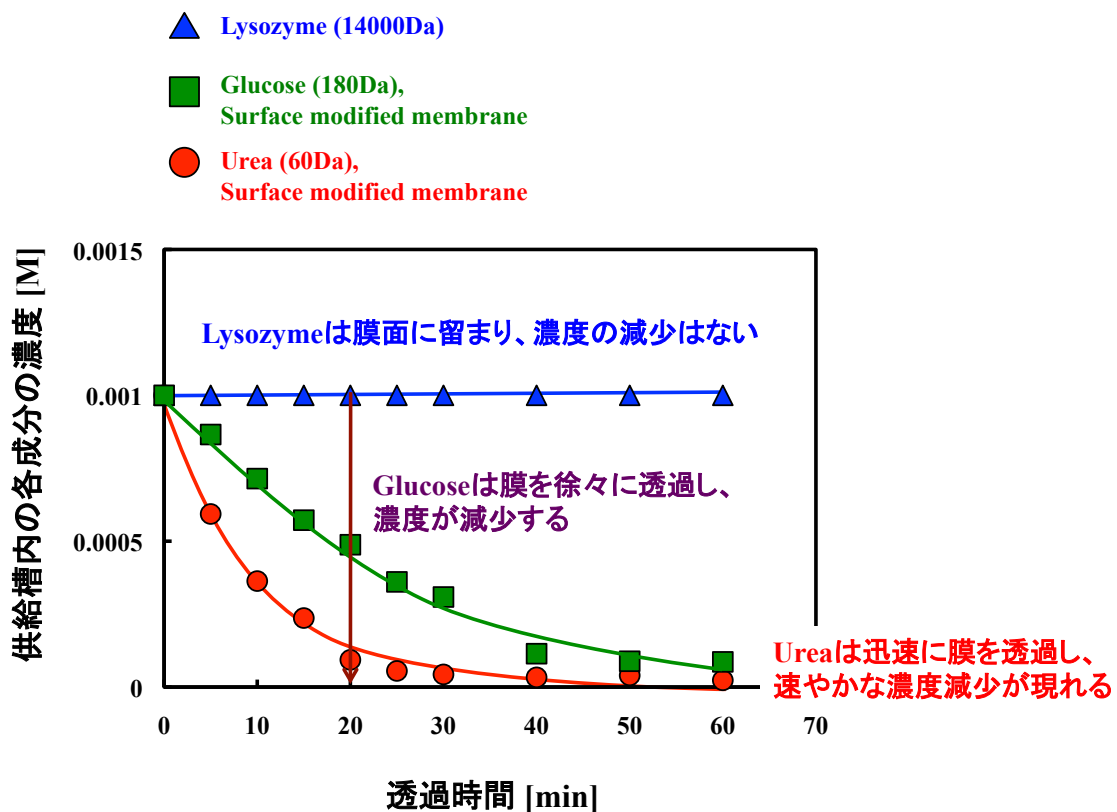


Figure 9-2 表面改質した chitosan 膜による三成分混合系の選択透過の一例。

上記の概念を総合的に Figure 9-3 に示す。まず、バイオ生産物の多成分系原料を個別に分離する場合は、上流側においては高い溶媒透過流束を維持して大きな分子群（例えばタンパク質など）を膜によって捕獲する。本研究ではモデル的に Lysozyme と BSA の例を示した。次いで、中程度の分子群の代表としてグ



ルコースを  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜によって分離し、最終的には小さな分子の代表として尿素が膜を透過する。すなわち、本研究の膜を用いるとすれば、上流側に表面改質を施した chitosan 膜、下流側に  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜を用いることが提案できる。

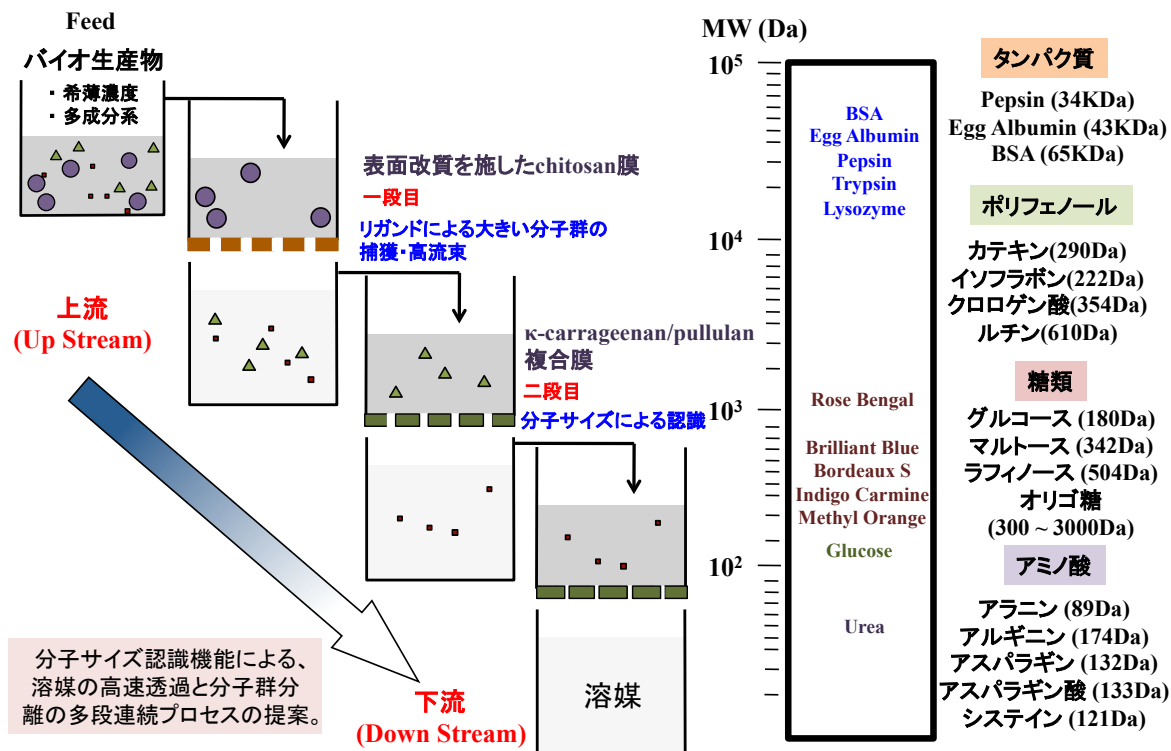


Figure 9-3 一連の研究結果を多段式膜分離プロセスとして利用した場合のイメージ。

### 9.3 本章の結論

多段膜分離プロセスにおいて、上流側 (Up Stream)では、Silica 微粒子を用いて形成された鑄型によって表面改質した chitosan 膜による高流束の実現を図るとともに、Cibacron Blue F3GA をリガンドとし、大きな分子群 (タンパク質等) を選択的に膜面に捕獲する大分子群の分離膜の利用を提案した。下流側 (Down Stream)では、 $\kappa$ -carrageenan と グルタルアルデヒドで架橋された pullulan 複合膜を用い、比較的小さい分子群(60~1017Da)を鋭敏に認識させ、選択分離膜としての可能性を提案した。

注目成分の分子サイズに応じて分離操作の上流側と下流側をそれぞれ担当する高分子膜を新規に調製し、多段的かつ連続的な膜分離プロセスを提案した。

## 第 10 章 本研究の総括とオリジナリティー並びに展望

### 10.1 本研究の要旨

本研究は、自然界に大量に存在している食品由来の天然多糖類の付加価値の高い用途開発を目的として、糖鎖ネットワークの制御に注目し、新規な複合化により、生体高分子を高度利用するための基礎並びに応用研究を展開している。

第 1 章では、本研究で注目する chitosan、 $\kappa$ -carrageenan と pullulan の起源や化学組成について記述し、その糖鎖ネットワークの制御因子ならびに複合化の重要性について述べた。また、本研究の中心となる膜分離技術の特徴並びに生体高分子膜の応用例に触れるとともに、本研究の目的を述べた。

第 2 章では、一枚の chitosan 膜の実質的表面積を増す工夫として、膜の機械的強度を損なうことなく、微細な凹凸構造を silica 微粒子を鋳型として表面に形成し、膜の高流束の実現を図った。表面改質 chitosan 膜とオリジナル chitosan 膜の純水透過流束を比較した。Silica 微粒子で表面改質した膜の透過流束は約 1.4 倍上昇した。また、Chitosan 膜表面の微細な凹凸構造の形成により、機械的強度が低下することなく、実用に供し得る必要にして十分な機械的強度を保持できた。また、異なる分子量の chitosan による膜の機械的強度測定においては、分子量の高い chitosan 膜ほど最大剪断応力と最大伸長率が最も大きい値を示した。Silica 微粒子による鋳型によって表面改質された chitosan 膜は高い純水透過性能を示したことから、本研究の chitosan 膜は高流束を実現しつつ、大きな分子群を分離する可能性を有すると期待できる。

第 3 章では、chitosan 膜における分子量の異なるタンパク質 (Lysozyme (14000Da)、Trypsin (20000Da)、Pepsin (34000Da)、Egg Albumin (43000Da) と Bovine Serum albumin (BSA, 65000Da)) を用い、濃度勾配による拡散実験並びに限外濾過実験を行い、タンパク質に対する分離特性を検討した。濃度差を推進力とするタンパク質分子の膜内拡散実験の結果より、分子量変域 14000Da から 65000Da のタンパク質における有効拡散係数の値から判断して、chitosan 膜は顕著な分子分画機能を示した。また、表面改質しない chitosan 膜よりも表面改質した chitosan 膜の有効拡散係数が大きくなったことから、silica 微粒子による微細な凹凸構造の形成によって、膜の表面積が実質的に増大したことが示唆された。

タンパク質溶液の透過実験の結果から、膜面にタンパク質分子が静電的あるいは疎水的相互作用によって吸着するため、透過チャンネル閉塞による膜面積の減少により溶媒 (純水) の透過係数が減少した。一方、表面改質した chitosan

膜における BSA 水溶液の透過流束は、表面改質していない chitosan 膜の純水透過流束よりも約 20%高く、silica 微粒子による表面改質を施した chitosan 膜はタンパク質溶液の処理操作においても溶媒の高流束分離が実現できた。

第 4 章では、膜分離プロセスの上流側を担当する chitosan 膜にタンパク質分子に対する特異的吸着性能を持つリガンド (Cibacron Blue F3GA)を導入し、より効率よくタンパク質を捕獲した。

リガンドを導入した chitosan 膜では BSA の吸着量は導入前と比較して 6.6 倍増大した。タンパク質の吸着能を有する官能基を chitosan 分子鎖に固定することで、タンパク質の高効率捕獲と溶媒の高流束透過が両立できる chitosan 膜を調製することが可能であることを見出した。

第 5 章では、食品由来の生体高分子である  $\kappa$ -carrageenan と pullulan を複合させ、glutaraldehyde で架橋することにより、湿潤状態でも安定な自立複合膜の調製に成功した。構造多糖類であるため、水酸基に富み、glutaraldehyde による脱水縮合反応によって架橋を形成し、さらに、塩化カリウムの添加によって、 $\kappa$ -carrageenan 分子鎖間架橋を形成させて膜を形成した。さらに熱処理によって化学的架橋反応を進行させ、65°Cが最適な加熱温度と見出された。

$\kappa$ -carrageenan の質量存在割合 ( $F_C$ ) の増大に伴い、機械的強度は増大し、実際にできる強度を有する生体高分子膜が得られた。また、 $F_C$  の増大に伴い質量含水率は増大し、複合膜形成の制御因子として  $F_C$  の重要性が見出された。本研究の複合膜は高い含水率にもかかわらず機械的強度の損失がなく、膜内の有効拡散係数が高く期待できるので、丈夫で物質透過に優れた複合膜として期待できる。

第 6 章では、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合自立膜の分子分画機能とその有効な分子量範囲を明らかにするため、分子サイズの指標物質として Urea (60Da)、Glucose (180Da)、Methyl Orange (327Da)、Indigo Carmine (466Da)、Bordeaux S (604Da)、Brilliant Blue (826Da)、Rose Bengal (1017Da)を選択し、濃度勾配を推進力とする物質透過実験を行った。60Da から 1017Da の分子量の増分約 17 倍にも関わらず、膜内の有効拡散係数は 15,000 倍という顕著な変化を示し、複合膜は極めて鋭敏に分子サイズを認識し、物質分離膜としての可能性が認められた。また、 $\kappa$ -carrageenan 存在割合( $F_C$ )を制御することにより、膜内のネットワーク構造が変化し、目的に応じた物質透過性能を設計できる可能性があることを明らかにした。

第7章では、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の純水透過特性を評価した。透過流束  $J_v$  に対する操作時間  $t$ 、操作圧力  $\Delta P$ 、温度  $T$ 、透過溶液粘度  $\mu$  の依存性について検討を行った。膜内の純水透過機構は圧力の一次に比例し、円管内流動のモデルとして知られる Hagen-Poiseuille 流れの機構に従っていることが示唆された。

ただし、純水透過流束の経時変化の上で、 $\kappa$ -carrageenan の存在割合( $F_C$ )の変化により透過流束に大きな影響を与えたことで、 $F_C$  の値が高分子網目構造の形成に支配的になるとともに、透過溶液の温度と粘度との上昇により透過流束が  $F_C$  の高い複合膜における変化が比較的激しいという興味深い挙動を示した。

第8章では、分子量としての変域 327Da から 1017Da までを対象とし、 $F_C$ 0.33 と  $F_C$ 0.66 二種類の膜を用いて色素成分の分子サイズに基づく分離性能について評価した。

- ①  $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜は高い透過流束を維持しながら、色素分離に成功した。比較的分子量の高い Rose Bengal (1017Da) に対し、ほぼ 100% の阻止率を達した。
- ② 分画分子量曲線により、 $F_C$ 0.33 膜の分画分子量は 327Da であり、 $F_C$ 0.66 膜の分画分子量は 466Da であった。
- ③ Indigo Carmine に対する脱色性が特に顕著であることから、 $F_C$  の値が膜内のネットワークの変化を支配していることが示唆された。
- ④ 膜内の物質透過チャンネル平均サイズの変化領域は Indigo Carmine の分子サイズ (約 12Å) に相当する。

第9章では、多段膜分離プロセスにおいて、上流側 (Up Stream) には、Silica 微粒子による鋳型による chitosan 膜表面改質を行い、高流束の実現を図るとともに、Cibacron Blue F3GA をリガンドとして、大きな分子群 (タンパク質等) を選択的に膜面に捕獲する群分離の分離膜として可能性を示した。下流側 (Down Stream) には、 $\kappa$ -carrageenan と pullulan を複合させて、調製した複合膜により、特定の分子量範囲(60~1017Da)を鋭敏に認識する能力を活用して、精密分離膜としての可能性を示した。上流側に分子量別の群分離膜と下流側に分子サイズを鋭敏に認識する精密分離膜を食品由来の生体ポリマーによって新規に調製し、分離操作の多段的かつ連続的なプロセスを提案した。

第10章では、本研究の膜による多段膜分離プロセスを紹介するとともに、本研究のオリジナリティーをまとめた。

本研究は、糖鎖ネットワークの制御に注目し、新規な複合化により、生体高分子を高度利用するための基礎並びに応用研究を展開した。一連の研究成果により、食品由来の生体高分子の複合化と化学修飾により、糖鎖ネットワークの制御を実現し、注目成分の特性に応じて分離操作の上流側と下流側をそれぞれ担当する高分子膜を新規に調製し、分離操作の多段的かつ連続的なプロセスを提案した。

## 10.2 本研究のオリジナリティーと価値

本研究は食品由来の生体高分子の可能性に注目し、自立した高分子膜としての製膜方法の確立に成功するとともに、高分子量のタンパク質 (Lysozyme、BSA など) から低分子量の尿素までの領域で、それぞれ膜の優れた分子サイズ認識能力を明らかにした。chitosan 膜においては silica 微粒子、 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜においては  $\kappa$ -carrageenan の質量存在割合によって高分子ネットワーク構造を制御できることを初めて見出した。

海洋性ポリマーによる生体由来成分による高分子膜調製の成功は、食品利用の分野に限定されていた海洋性ポリマーの可能性を飛躍的に拡張し、持続可能な環境負荷の小さい高分子による膜科学の進展を告げるものである。海洋性ポリマーは地上のセルロースに次いで豊富に存在する生体由来の高分子であり、海洋中に生育するため、地上のように気候変動の影響を敏感に受けずに安定的に収穫することが期待できる。陸地が穀類の耕地や住宅地・工業地帯に占められて、地目が限定されているが、日光が海底まで届くような沿海部は海洋性藻類が繁茂出来る海洋国家においては有望な耕地とさえみなすことができる。海洋性藻類の繁茂は地球の温暖化の予防に効果的であり、漁業と共益的に存在することが期待できる。

生体高分子としてカニ・エビ殻などとして廃棄されている資源から得られる chitosan に関しては、反応性に富むアミノ基をその高分子鎖に多く有することに着目し、特定の分子種に高い選択性を有するリガンドを化学修飾によって固定化し、タンパク質やペプチド等の医薬原料となるバイオ系機能性分子の分離を試みた。特に、高い透過流束を実現するため、キャスト液に silica 微粒子を混合することにより、比較容易な操作で表面改質を施すことにより、膜の実質的な表面積を増大させることに成功した。これにより、Chitosan 膜においては、溶媒の透過高流束が実現するため、微細粒子による鋳型形成をキトサン膜の表面改

質の手法として導入し、膜の機械的強度を損なうことなく膜一枚当たりの流束の向上を図った点は本研究のオリジナルである。一方、分子認識機能のリガンドとしてタンパク質親和性の高い Cibacron Blue F3GA を膜の化学修飾として導入し、タンパク質の選択的吸着と分子ふるい効果を合わせもった高流束の高度分離を行うことを提案した。それによって、分離操作の上流側 (Up Stream) を担当する分離膜としての可能性を見出した点は膜分離プロセスとして工学的価値が高い (第 2~5 章)。

澱粉を原料とし、黒酵母の一種である *Aureobasidium pullulans* を培養して得られる多糖類の pullulan と海藻由来の高分子( $\kappa$ -carrageenan)との複合化を試みた。二種の生体高分子 (pullulan and  $\kappa$ -carrageenan) の複合化として、糖鎖ネットワークの構造制御の指標として  $\kappa$ -carrageenan 存在割合 ( $F_C$ ) に注目するとともに分子量 60 ~ 604Da の範囲で有効拡散係数が 15000 倍変化することを見出した点は本研究のオリジナル成果である。その精密な分子サイズの認識能力によって分離操作の下流側 (Down Stream) を担当する分離膜としての可能性を見出した点はすでに第 2~5 章で記した chitosan 膜の成果とともに膜分離プロセスとして工学的価値が高い (第 6~8 章)。

一連の研究成果は、食品由来の生体高分子の複合化と化学修飾により、糖鎖ネットワークの制御を実現し、注目成分の特性に応じて分離操作の上流側と下流側をそれぞれ担当する高分子膜を新規に調製し、分離操作の多段的かつ連続的なプロセスを提案することができる可能性を示した点でオリジナルであり、生体高分子機能性を有した新素材開発へのアプローチとして生物資源科学としての価値は高い。

### 10.3 本研究課題と今後の展望

食品由来の生体高分子は可食性ポリマーとしての用途以外は多く廃棄されており、循環・再生産可能なポリマー素材として、また、石油由来ポリマーの代替品としても新規の用途開発は重要である。デンプンは人類共通の主食を構成する分子であるが、構造多糖類として工業原料の視点から見直し、付加価値の高い機能性素材として活用できれば、食としての生物資源の新しい高度利用に資するばかりでなく、食品産業の多角的な展開としても期待できる。

本研究で達成した一連の研究成果に基づき、提案した膜多段分離操作における上流側と下流側をそれぞれ担当する生体高分子膜の研究・開発における今後

の課題と展望について詳述する。

第 2 章で扱った chitosan は自然界で唯一の塩基性多糖類であり、食品由来の生体高分子の中では例外的に結晶性が高く、高温・高塩基性の溶液でも安定である。その特徴を利用し、製膜時に silica 微粒子を添加し、chitosan 膜面に被覆した silica 微粒子を高温・高塩基性の処理によって膜のネットワークを損なうことなく脱離させ、chitosan 膜の表面に微細な凹凸構造を形成させた。これによって、鑄型としての silica 微粒子が溶け出した跡は膜表面積の増大分となり、純水透過性能の向上に繋がった。しかしながら、本研究の silica 微粒子の添加量は単純計算でも 93 層分に相当する大量に及んでおり、大過剰の silica 微粒子の添加によって、純水透過係数の増大は現れなかった。今後は、製膜時の表面単位面積あたりの silica 微粒子の数密度と透過流束との相関によりもとめることによって chitosan の最適添加量をもとめる。

第 3 章においては、単一成分系の大きな分子群タンパク質並びに小さな分離群グルコースなどの膜内の有効拡散係数を求め、chitosan 膜はタンパク質に対する捕獲機能を見出し、グルコースや尿素等の小さい分子群は膜を透過することを証明できた。しかし、実際の分離操作では、単一成分の物質を含む溶液を透過させることは極めて稀であり、通常は多成分の溶液が分離の対象となる。タンパク質は溶液中で荷電を持つため、分子間には静電的な相互作用が働き、その透過特性にも複雑な影響を与えることが予想される。二つ以上の成分を含む場合には、静電的相互作用の影響とともに、膜面に透過できない分子が蓄積する濃度分極の影響も考慮する必要がある。

第 4 章では、タンパク質との特異的結合のリガンド Cibacron Blue F3GA を chitosan 膜に導入し、大きな分子の代表としてタンパク質 (BSA) の吸着量は 6.6 倍に増大したことから、大きな分子群の捕獲にリガンドが有効であることが確認できた。今後は他のリガンドも検討して選択性の向上を目指したい。

一方、吸着したタンパク質を回収し、吸着剤を再生するためには脱着操作が有効に行われる必要がある。したがって、あまり吸着が強固であると脱着が十分に行われず。また、膜面に吸着されたタンパク質を除去し、透過流束の回復と膜の再利用をする必要がある。他に chitosan の脱アセチル化度による膜の使用耐性を溶液の pH とともに検討すること、chitosan の平均分子量による製膜性の相違についても検討する必要がある。

第 5 章ではキャスト液内の高分子の溶解状態と溶媒蒸発時の構造形成に掛か

る緩和現象の解明が課題となる。膜形成時の溶媒蒸発速度が、最終的に得られる高分子膜構造を支配する重要な因子となる可能性がある。実用化に向けて、膜の大量生産を念頭に置いた高速連続製膜プロセスが展開されると思われる。 $\kappa$ -carrageenan/pullulan 複合膜の製膜法のスケールアップ因子をさらに検討する必要がある。

第 6 章では、複合膜の  $\kappa$ -carrageenan の存在割合と分子サイズ認識能力の関係を解明し、今後は、実験環境に対する耐性（透過溶液の pH など）を確認する必要がある。

分離膜としての利用を考えるにあたって、純水の透過性能を把握することはその基礎として重要である。今後は、装置設計に向けて次のデータを検討する必要がある。

- ① 圧力と透過流束の再現性の確認
- ② 供給側溶液の pH を変えた場合の透過流束
- ③ いくつかの濃度レベルで、透過液を反復させ、時間とともに透過流束が一定であることの確認

膜のコンスティチューション対策として洗浄法の確立が重要である。そのためには被処理液と膜との相互作用を調べ、純水の透過流束が使用前で一定であるかを確認する必要がある。膜の寿命に影響を与えない洗浄方法または洗剤の開発が必要である。

第 9 章では、全体的に実証実験をする必要がある。多段膜分離プロセスを取り扱う場合は、圧力差と濃度勾配の両者を推進力として分離を行う。透過を継続することによって、高分子膜面及び膜内の物質透過チャンネルに汚れが蓄積していくと、高分子膜の透過抵抗が増加すると予想される。膜が処理液中の特定の溶質と相互作用をして膜面付近に可逆的、あるいは不可逆的に固定してしまう汚染（Fouling）の予防とその除去は重要である。

膜の洗浄と透過性能の回復方法としては、

- ① 機械的方法 — スポンジボール、泡、高流速流、逆流、超音波など
- ② 化学的方法
  - (1) 可溶化 — 酸、アルカリ、酵素、pH など
  - (2) イオン結合切断 — イオン強度、pH、 $\zeta$  電位
  - (3) 酸化 — 過酸化水素、次亜塩酸ソーダ、過ホウ酸、過炭酸など
  - (4) 浸透作用 — リン酸塩、ポリリン酸塩、界面活性剤



(5) 再付着防止 — CMC、界面活性剤など

これらの方法を組み合わせることによって、長時間運転並びに膜の長寿命化が期待できる。

食品由来の生体高分子は新しい膜素材の構築ベースとして高いポテンシャルを秘めている。生体高分子膜は分離工学に限らず、機能性成分の担体としてもその可能性を拡張してゆくと期待することができる。

## Nomenclature

A	Membrane surface [m <sup>2</sup> ].
C <sub>f</sub>	Concentration in the feed solution [mol L <sup>-1</sup> ].
C <sub>f0</sub>	Initial concentration in the feed solution [mol L <sup>-1</sup> ].
C <sub>s</sub>	Concentration in the stripping solution [mol L <sup>-1</sup> ].
C <sub>s0</sub>	Initial concentration in the stripping solution [mol L <sup>-1</sup> ].
c	Concentration of polymer [g dL <sup>-1</sup> ], used in chapter 2
D	Diffusion coefficient estimated from Wilke-Chang equation in bulk aqueous phase [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ].
D <sub>eff</sub>	Effective diffusion coefficient in the membrane [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ].
D <sub>c</sub>	Diameter of mass transfer channel in membrane [m], used in chapter 3
DD	Deacetylation degree [%] defined in page 20.
F <sub>C</sub>	Mass fraction of κ-carrageenan in composite membrane [-], defined in page 55.
f	Factor of 0.0025 N PVS-K [-]
J <sub>V</sub>	Volumetric permeate flux [m <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ].
k <sub>L1</sub>	Film mass transfer coefficient in the feed phase [m s <sup>-1</sup> ].
k <sub>L1</sub> <sup>-1</sup>	Film mass transfer resistance in the feed phase [(m s <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> ].
k <sub>L2</sub>	Film mass transfer coefficient in the stripping phase [m s <sup>-1</sup> ].
k <sub>L2</sub> <sup>-1</sup>	Film mass transfer resistance in the stripping phase [(m s <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> ].
k <sub>m</sub>	Mass transfer coefficient of the membrane (=D <sub>eff</sub> /l) [m s <sup>-1</sup> ].
k <sub>m</sub> <sup>-1</sup>	Mass transfer resistance of the membrane [(m s <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> ].
K <sub>OL</sub>	Overall mass transfer coefficient [m s <sup>-1</sup> ], defined in page 36.
K <sub>OL</sub> <sup>-1</sup>	Overall mass transfer resistance [(m s <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> ].
K	Empirical parameter of the Mark-Houwink-Sakurada equation [-].
l	Membrane thickness [m].
L <sub>c</sub>	Length of mass transfer channel in membrane [m].
L <sub>p</sub>	Permeability coefficient of water [m <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> m <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ].
M <sub>B</sub>	Molecular weight of solvent B [g mol <sup>-1</sup> ], using in Wilke-Chang equation.
N	Mass transfer flux [mol s <sup>-1</sup> ].
ΔP	Operational pressure [Pa]

$R_{\text{obs}}$	Resistance [-], used in Eq. (8-1)
$t$	Time [s].
$T$	Temperature [K]
$u$	Flow rate of water in mass transfer channel [ $\text{m s}^{-1}$ ].
$V$	Volume of aqueous solution in the transfer cell [ $\text{m}^3$ ].
$v$	Volume of 0.0025N PVS-K on colloidal titration [mL].
$V_A$	Molecular volume of solute at his boiling point A [ $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ ], used in Wilke-Chang equation.
$w_d$	Mass of dried membrane [g]
$w_e$	Initial mass of the swollen membrane [g].
$w_t$	Mass of total contained water [g].

### Greek symbols

$\alpha$	Empirical parameter of the Mark-Houwink-Sakurada equation [-].
$\beta$	Empirical constant of the Mead-Fuoss equation [-].
$\eta$	Viscosity of solution [cP].
$[\eta]$	Intrinsic viscosity [ $\text{dL g}^{-1}$ ].
$\eta_{\text{rel}}$	Relative viscosity [-], defined in page 18.
$\eta_{\text{sp}}$	Specific viscosity [-], defined in page 18.
$\eta_0$	Viscosity of solvent [cP], used in Eq.(2-1).
$\mu$	Viscosity of feed solution [ $\text{mPa s}$ ], used in Eq.(2-1)
$\rho$	Density of solvent [ $\text{kg m}^{-3}$ ]
$\rho_M$	Density of the swollen membrane [ $\text{kg m}^{-3}$ ]
$\rho_w$	Density of the pure water [ $\text{kg m}^{-3}$ ]
$\phi$	The association parameter of solvent [-], used in Wilke-Chang equation.

### Abbreviations

BSA	Bovine serum albumin.
EA	Egg albumin.
MO	Methyl Orange.
IC	Indigo Carmine.
BS	Bordeaux S.

BB	Brilliant Blue.
RO	Rose Bengal.
SEM	Scanning electron microscope.
MW	Molecular weight [ $\text{g mol}^{-1}$ ], [Da].
MS	Molecular size [ $\text{\AA}$ ].
MV	Molecular volume [ $\text{mol m}^{-3}$ ].

## References

- Abad.L.V., H. Kudo., S. Saiki., N. Nagasawa., M. Tamada., H. Fub., Y. Muroya., M. Lin .,Y. Katsumura., L.S. Rellve., C.T. Aranilla., A.M. DeLaRosa. (2010). Radiolysis studies of aqueous  $\kappa$ -carrageenan. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 268, 1607-1612.
- Alp B., Mutltu S., Mutlu M. (2000) Glow-discharge-treated cellulose acetate (CA) membrane for a high linearity single-layer glucose electrode in the food industry. *Food Research International*. 33: 107-112.
- Alvarez-Hornos F.J., Volckaert D., Heynderickx P.M., Langenhove H.V. (2011) Performance of a composite membrane bioreactor for the removal of ethyl acetate from waste air. *Bioresource Technology*. 102: 8893-8898.
- Abd-Elmohby F.A., Sayed Z.E., Essam S. and Hebeish A., 2010. Controlling chitosan molecular weight via bio-chitosan analysis. *Carbohydr. Polym.* 82, 539-542.
- Barnett.Christian., Alan Smith., Bernard Scanlon., Cleanthes J. Israilides. (1999). Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste. *Carbohydrate Polymers* 38, 203-209.
- Beppu M.M., Vieira R.S., Aimoli C.G., Santana C.C. (2007) Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. *Journal of Membrane Science*. 301: 126-130.
- Bixler H.J., Johndro K., Falshaw R. (2001). Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts II. Performance in two simulated dairy applications. *Food Hydrocolloids*, 15: 619-630.
- Blocher C., Noronha M., Funfrocken L., Dorda J., Mavrov V., Janke H.D., Chmiel H. (2002) Recycling of spent process water in the food industry by an integrated process of biological treatment and membrane separation. *Desalination*. 144: 143-150.
- Baltus R.E. (1997) Characterization of the pore area distribution in porous membranes using transport measurements. *Journal of Membrane Science*. 123: 165-184.
- Bazinet L., DeGradpre Y. and Porter A., 2005. Enhanced tobacco polyphenol electromigration and impact on membrane integrity. *J. Membrane Sci.* 254, 111-118.
- Campo.VanessaLeiria., Daniel Fábio Kawano., DílsonBrazda Silva Jr., IvoneCarvalho. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis-A review. *Carbohydrate Polymers* 77, 167-180.

- C. Valenta, K. Schultz, Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations, *Journal of Controlled Release*, 95 (2004) 257-265.
- Catherine C. (2009) A review of membrane processes and renewable energies for desalination. *Desalination*. 245: 214-231.
- Clark A.H. (1996) Biopolymer gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 1: 712-717.
- Chen C.X., Han B.B., Li J.D., Shang T.G., Jiang W.J. (2001) A new model on the diffusion of small molecule penetrants in dense polymer membranes. *Journal of Membrane Science*. 187: 109-118.
- Cojocariu A., Profire L., Aflori M. and Vasile C., 2012. *In vitro* drug release from chitosan/Cloisite 15A hydrogels. *Appl. Clay Sci.* 57, 1-9.
- Croisier F. and Jerome C., 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* 49, 780-792.
- Chikh L., Delhorbe V. and Fichet O., 2011. (Semi-)Interpenetrating polymer networks as fuel cell membranes. *J. Membrane Sci.* 368, 1-17.
- DeMelo.J.V., M.E. Bello.,W.M. de Azevedo., J.M. de Souza, F.B. Diniz. (1999). The effect of glutaraldehyde on the electrochemical behavior of polyaniline. *Electrochimica Acta* 44, 2405-2412.
- Devi D.A., Smitha B. Sridhar S. Aminabhavi T.M. (2005) Pervaporation separation of isopropanol/water mixtures through crosslinked chitosan membranes. *Journal of Membrane Science*. 262: 91-99.
- Dea I.C.M. Mckinnon A.A. & Rees D.A. (1972) Tertiary and Quaternary Structure in Aqueous Polysaccharide Systems which Model Cell Wall Cohesion: Reversible Changes in Conformation and Association of Agarose, Carrageenan and Galactomannans. *Journal of Molecular Biology*, vol.68, pp.153-172.
- Datta S., Mody K., Gopalsamy G., Jha B. (2011) Novel application of  $\kappa$ -carrageenan: As a gelling agent in microbiological media to study biodiversity of extreme alkaliphiles. *Carbohydrate Polymers* 85: 465-468.
- Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M. and Chiellini E., 2011. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 36, 981-1014.
- El Gamal A.A. (2010) Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*. Vol.18, pp.1-25.
- Ekstrom A.G., Kuivinen J. (1983) Molecular weight distribution and hydrolysis

- behaviour of carrageenans. *Carbohydrate Research*. 116: 89-94.
- Elimelech M., Zhu X.H., Childress A.E., Hong C.S. (1997) Role of membrane surface morphology in colloidal fouling of cellulose acetate and composite aromatic polyamide reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science*. 127: 101-109.
- F. Elazhar, M. Tahaikt, A. Achatei, F. Elmidaoui, M. Taky, F. E. Hannouni, I. Laaziz, Jariri, M. E. Amrani, A. Elmidaoui, Economical evaluation of the fluoride removal by nanofiltration, *Desalination*, 249 (2009) 154-157.
- Falshaw R., Bixler H.J., Johndro K. (2001) Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts I. Structure analysis. *Food Hydrocolloids*. 15: 441-452.
- Feil H., Bae Y.H., Feijen J., Kim S.W. (1991) Molecular separation by thermosensitive hydrogel membranes. *Journal of Membrane Science*. 64: 283-294.
- Fatt I. & Goldstick T.K. (1965) Dynamics of water transport in swelling membranes, *J. Colloid Sci.* 20: 962-989.
- G. Capar, U. Yetis, L. Yilmaz, Membrane based strategies for the pre-treatment of acid dye bath wastewaters, *Journal of Hazardous Materials B*, 135 (2006) 423-430.
- Guessasma S., Hamdi A., Lourdin D. (2009) Linear modeling of biopolymer systems and related mechanical properties. *Carbohydrate Polymer*. 76: 381-388.
- Gupta K.C. and Jabrail F.H., 2006. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohyd. Polym.* 66, 43-54.
- Govender S., Przybylowicz W.J., Jacobs E.P., Bredenkamp M.W., Kralingen L.V. and Swart P., 2006. A Pluronic-coupled metal-chelating ligand for membrane affinity chromatography. *J. Membrane Sci.* 279, 120-128.
- Guo W. and Ruckenstein E., 2001. A new matrix for membrane affinity chromatography and its application to the purification of concanavalin A. *J. Membrane Sci.* 182, 227-234.
- Guo W. and Ruckenstein E., 2003. Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *J. Membrane Sci.* 211, 101-111.
- Han.J.H.,GennadiosAristippos. (2005). Edible films and coatings: A review. *Innovations in Food Packaging*, 239-262.
- Hayat.M.A. (1986). Glutaraldehyde: Role in electron microscopy. *Micron and MicroscopicaActa*. Vol. 17, No. 2, pp. 115-135.
- H. Jian, Z. Kaisong, The high flux poly (m-phenylene isophthalamide) nanofiltration

- membrane for dye purification and desalination, *Desalination*, 282 (2011) 19-26.
- Huang X.J., Ge D., Xu Z.K. (2007) Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*. 43: 3710-3718.
- Hu J.H., Song L.F., Ong S.L., Phua E.T., Ng W.J. (2005) Biofiltration pretreatment for reverse osmosis (RO) membrane in a water reclamation system. *Chemosphere*. 59: 127-133.
- Hirose M., Ito H. and Kamiyama Y., 1996. Effect of skin layer surface structures on the flux behaviour of RO membranes. *J. Membrane Sci.* 121, 209-215.
- Huang J., Wang Y.C., Li C.L., Lee K.R., Fan S.C., Wu T.T. and Lai J.Y., 2002. Dehydration of water–alcohol mixtures by pervaporation and vapor permeation through surface resintering expanded poly(tetrafluoroethylene) membranes, *Eur. Polym. J.* 38, 179-186.
- Hu C.Y., Lo S.L., Chang C.L., Chen F.L., Wu Y.D. and Ma J.L., 2013. Treatment of highly turbid water using chitosan and aluminum salts. *Sep. Purif. Technol.* 104, 322-326.
- I.T. Norton, W.J. Frith, Microstructure design in mixed biopolymer composites, *Food Hydrocolloids*, 15 (2001) 543-553.
- Jayakrishnan .A., S.R. Jameelas. (1996). Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterids* 17, 471-484.
- J. H. Huang, C.-F. Zhou, G.-M. Zeng, X. Li, J. Niu, H.-J. Huang, L.-J. Shi, S.-B. He, Micellar-enhanced ultrafiltration of methylene blue from dye wastewater via a polysulfone hollow fiber membrane, *Journal of Membrane Science*, 365 (2010) 138-144.
- Jonsson G. (1985) Molecular weight cut-off for ultrafiltration membranes of varying pore size. *Desalination*. 53: 3-10.
- Krochta, J.M., & De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51 (2), 61-74.
- Kara.Selim.,CandanTamerler., HakanBermek., OnderPekcan. (2003). Cation effects on sol-gel and gel-sol phase transitions of k-carrageenan-water system. *International Journal of Biological Macromolecules* 31, 177-185.
- Krishna R.K.S.V., Vijaya B. Naidu K., Subha M.C.S. , Sairam M. , Mallikarjuna N.N., Aminabahvi T.M. (2006) Novel carbohydrate polymeric blend membranes in



- pervaporation dehydration of acetic acid. *Carbohydrate Polymer*. 66: 345-351.
- Kumar A., Srivastava A., Galaev I.Y., Mattiasson B. (2007) Smart polymer: Physical forms and bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.* 32: 1205-1237.
- Kashima K., Imai M. Suzuki I. (2010) Superior molecular size screening and mass-transfer characterization of calcium alginate membrane. *Desalination and water treatment*. 17: 143-159.
- Kashima K., Imai M. (2011) Dominant impact of the  $\alpha$ -L-guluronic acid chain on regulation of the mass transfer character of calcium alginate membranes. *Desalination and water treatment*. 134: 257-265.
- Kabay N., Bryjak M., Schlosser S., Kitis M., Avlonitis S., Matejka Z., Al-Mutaz I., Yuksel M. (2008) Adsorption-membrane filtration (AMF) hybrid process for boron removal from seawater: an overview. *Desalination*. 223: 38-48.
- Krajewska B. & Olech A. (1996) Pore structure of gel chitosan membranes. I. Solute diffusion measurements. *Polymer Gels and Networks*. 4: 33-43.
- Kai T., Goto G., Shimizu Y., Yamaguchi T., Nakao S. and Kimura S., 2005. Development of crosslinked plasma-graft filling polymer membranes for the reverse osmosis of organic liquid mixtures. *J. Membrane Sci.* 265, 101-107.
- Khulbe K.C., Chowdhury G., Kruczek B., Vujosevic R., Matsuura T. and Lamarche G., 1997. Characterization of the PPO dense membrane prepared at different temperatures by ESR, atomic force microscope and gas permeation. *J. Membrane Sci.* 126, 115-122.
- Kou C.H., Liu Y.C., Chang C.J., Chen J.H., Chang C. and Shieh C.J., 2012. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 87, 2538-2545.
- Khor E. and Lim L.Y., 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24, 2339-2349.
- L. yang, Z. Shuling, Z. Zheng, R. Jiannan, G. Zhi, L. Jiashuang, W. Guibin, Novel sulfonate thin-film composite nanofiltration membranes with improved water flux for treatment of dye solutions, *Journal of Membrane Science*, 394-395 (2012) 218-229.
- Lee K.P., Arnot T.C. Mattia D. (2011) A review of reverse osmosis membrane materials for desalination-Development to date and future potential. *Journal of Membrane Science*. 370:1-22.
- Lee Y. M. & Shin E. M. (1991) Pervaporation separation of water-ethanol through

- modified chitosan membranes. IV. Phosphorylated chitosan membranes. *Journal of Membrane Science*. 64: 145-152.
- Lazaridou A., Biliaderis C.G., Kontogiorgos V. (2003) Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polymers*. 52: 151-166.
- Lebrun L., Blanco J.F., Metayer M. (2005) Preparation of ion-exchange membranes using pullulan as polymer matrix. *Carbohydrate Polymers*. 61: 1-4.
- Lameloise M., Matinier H., Fargues C. (2009) Concentration and purification of malate ion from a beverage industry waste water using electrodialysis with homopolar membranes. *Journal of Membrane Science*. 343: 73-81.
- Li X.L., Zhu L.P., Zhu B.K., Xu Y.Y. (2011) High-flux and anti-fouling cellulose nanofiltration membranes prepared via phase inversion with ionic liquid as solvent. *Separation and Purification Technology*. 83: 66-73.
- Mangione.M.R., D. Giacomazza, D. Bulone., V. Martorana., G. Cavallaro., P.L. San Biagio. (2005).  $K^+$  and  $Na^+$  effects on the gelation properties of n-Carrageenan. *Biophysical Chemistry* 113, 129-135.
- M. Simonič, A. Lobnik, The efficiency of a hybrid flocculation/UF process for a real dye-house effluent using hydrophilic and hydrophobic membranes, *Desalination*, 271 (2011) 219-224.
- M. Thommesa, W. Blaschek, P. Kleinebudde, Effect of drying on extruded pellets based on  $\kappa$ -carrageenan, *European journal of pharmaceutical sciences*, 31 (2007) 112-118.
- McCray S.B, Vilker V.L. & Nobe. K. (1991) Reverse osmosis cellulose acetate membranes. I. Rate of hydrolysis. *Journal of Membrane Science*. 59: 305-316.
- Millane R.P, Chandrasekaran R., Arnott S. (1988) The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan. *Carbohydrate Research*, 183: 1-17.
- Miao J., Chen G., Gao C., Dong S.X. (2008) Preparation and characterization of N,O-carboxymethyl chitosan/Polysulfone composite nanofiltration membrane crosslinked with epichlorohydrin. *Desalination*. 233: 147-156.
- Misdan N., Lau W.J., Ismail A.F. (2012) Seawater Reverse Osmosis (SWRO) desalination by thin-film composite membrane-Current development, challenges and future prospects. *Desalination*. 287: 228-237.
- Martelli S.M., Moore G.R.P., Laurindo J.B. (2006) Mechanical Properties, Water Vapor

- Permeability and Water Affinity of Feather Keratin Films Plasticized with Sorbitol. *J. Polym. Environ.* 14: 215-222.
- Matsuoka Y., Kanda N., Lee Y.M., Higuchi A. (2006) Chiral separation of phenylalanine in ultrafiltration through DNA-immobilized chitosan membranes. *Journal of Membrane Science.* 280: 116-123.
- Miyabe K., Isogai R. (2011) Estimation of molecular diffusivity in liquid phase systems by the Wilke–Chang equation. *Journal of Chromatography A.* 1218: 6639-6645.
- Mehdizadeh H., Molaiee-Nejad K., Chong Y.C. (2005) Modeling of mass transport of aqueous solutions of multi-solute organics through reverse osmosis membranes in case of solute–membrane affinity Part 1. Model development and simulation. *Journal of Membrane Science.* 267: 27-40.
- Meng L., Gou H., Dong Z.Y., Jiang H., Xing W.H. and Jin W.Q., 2013. Ceramic hollow fiber membrane distributor for heterogeneous catalysis: Effects of membrane structure and operating conditions. *Chem. Eng. J.* 223, 356-363.
- Openshaw.K. (2010). Biomass energy: Employment generation and its contribution. *Biomass and bioenergy* 34, 365-378.
- Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P. (2009) Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer Science.* 34: 641-678.
- Peeva P.D., Million N., Ulbricht M. (2012) Factors affecting the sieving behavior of anti-fouling thin-layer cross-linked hydrogel polyethersulfone composite ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science.* 390-391: 99-112.
- Papageorgiou S.K., Katsaros F.K., Favvas E.P., Romanos G.E., Athanasekou C.P., Beltsios K.G., Tziaila O.I., Falaras P. (2012) Alginate fibers as photocatalyst immobilizing agents applied in hybrid photocatalytic/ultrafiltration water treatment processes. *WATER RESEARCH.* 46: 1858-1872.
- Peppas N. A., Reinhart C. (1983) SOLUTE DIFFUSION IN SWOLLEN MEMBRANES. PART I. A NEW THEORY. *Journal of Membrane Science.* 15: 275-287.
- Puttipipatkachorn S., Nunthanid J., Yamamoto K. and Peck G.E., 2001. Drug physical state and drug–polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. *J. Control Release* 75, 143-153.
- R. N. Aleksandra ,J. V. Sava, Characterization of chitosan/montmorillonite membranes as adsorbents for Bezactiv Orange V-3R dye, *Journal of Hazardous Materials,*

- 209-210 (2012) 256-263.
- Rinaudo M. (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31: 603-632.
- Rasmussen R.S. & Morrissey M.T. (2007) Marine biotechnology for production of food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research.* 52: 237-292.
- Redondo J., Busch M., Witte J.D. (2003) Boron removal from seawater using FILMTECTM high rejection SWRO membranes. *Desalination.* 156: 229-238.
- Rao P.S., Smitha B.S., Sridhar S., Krishnaiah A. (2006) Preparation and performance of poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine blend membranes for the dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation: Comparison with glutaraldehyde cross-linked membranes. *Separation and Purification Technology.* 48: 244-254.
- Rees D.A., 1969. Structure, Conformation, and Mechanism in the Formation of Polysaccharide Gels and Networks. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 24, 267-332.
- Rei M.H., Yeh G.T., Tsai Y.H., Kao Y.L. and Shiau L.D., 2011. Catalysis-spillover-membrane. III: The effect of hydrogen spillover on the palladium membrane reactor in the steam reforming reactions. *J. Membrane Sci.* 369, 299-307.
- Seydim, A. C., & Saikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39, 639-644.
- Singh. Ram S., Gaganpreet K. Saini, John F. Kennedy. (2008). Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers* 73, 515-531.
- Sakata.Yukoh., Makoto Otsuka. (2009). Evaluation of relationship between molecular behaviour and mechanical strength of pullulan films. *International Journal of Pharmaceutics* 374, 33-38.
- S.K. Maurya, K. Parashuram, P.S. Singh, P. Ray, A.V.R. Reddy, Preparation of Polysulfone-polyamide thin film composite hollow fiber nanofiltration membranes and their performance in the treatment of aqueous dye solutions, *Desalination*, 304 (2012) 11-19.
- S.K. Papageorgiou, F.K. Katsaros, E.P. Favvas, G. E. Romanos, C.P. Athanasekou, Beltsios, O.I. Tziaila, P. Falaras, Alginate fibers as photocatalyst immobilizing agents applied in hybrid photocatalytic/ultrafiltration water treatment processes, *WATER RESERCH*, 46 (2012), 1858-1872.

- S. Datta, K. Mody, G. Gopalsamy, B. Jha, Novel application of  $\kappa$ -carrageenan: As a gelling agent in microbiological media to study biodiversity of extreme alkaliphiles, *Carbohydrate Polymers*, 85 (2011) 465-468.
- Shih F.F., Daigle K.W. Champagne E.T. (2011) Effect of rice wax on water vapour permeability and sorption properties of edible pullulan films. *Food Chemistry*. 127: 118-121.
- Sairam M., Sereewatthanawut E., Li K., Bismarck A., Livingston A.G. (2011) Method for the preparation of cellulose acetate flat sheet composite membranes for forward osmosis-Desalination using MgSO<sub>4</sub> draw solution. *Desalination*. 273: 299-307.
- Singh G., Rana D., Matsuura T., Ramakrishna S., Narbaitz R.M., Tabe S. (2010) Removal of disinfection byproducts from water by carbonized electrospun nanofibrous membranes. *Separation and Purification Technology*. 74: 202-212.
- Su M., Teoh M. M., Wang K. Y., Su J.C., Chung T.S. (2010) Effect of inner-layer thermal conductivity on flux enhancement of dual-layer hollow fiber membranes in direct contact membrane distillation. *Journal of Membrane Science*. 364: 278-289.
- Shah B.G., Shahi V.K., Thampy S.K., Rangarajan R., Ghosh P.K. (2009) Comparative studies on performance of interpolymer and heterogeneous ion-exchange membranes for water desalination by electrodialysis. *Desalination*. 172: 257-265.
- Shi J., Liu X., Shang Y., Cao S. (2010) Biomaterialized polysaccharide alginate membrane for multi-responsive controlled drug delivery. *Journal of Membrane Science*. 352: 262-270.
- T. Kim, C. Park, S. Kim, (2005) Water recycling from desalination and purification process of reactive dye manufacturing industry by combined membrane filtration, *Journal of Cleaner Production*, 13 779-786.
- Takahashi T., Imai M., Suzuki I., Sawai J. (2008) Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal*. 40: 485-491.
- Takahashi T., Imai M., Suzuki I. (2007) Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. *Biochemical Engineering Journal*. 36: 43-48.
- Trinetta V., Cutter C.N., Floros J.D. (2011) Effects of ingredient composite on optical and mechanical properties of pullulan film for food-packaging applications. *LWT – Food Science and Technology*. 44: 2296-2301.

- Tong Q., Xiao Q., Lim L.T. (2008) Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. *Food Research International*. 41: 1007-1014.
- Tres M.V., Mohr S., Corazza M.L., Luccio M.D. and Oliveira J.V., 2009. Separation of *n*-butane from soybean oil mixtures using membrane processes. *J. Membrane Sci.* 333, 141-146.
- Ueda S., Fujita K., Komatsu K. & Nakashima Z. (1963) Polysaccharide produced by the genus *Pullularia* I. Production of polysaccharide by growing cells. *Applied Microbiology*. 11: 211–215.
- Ulbricht M. (2006) Advanced functional polymer membranes. *Polymer*. 47: 2217-2262.
- Vospernik.Matevž.,AlbinPintar., GorazdBercic., JanezLevec. (2003). Mass transfer studies in gas–liquid–solid membrane contactors. *Catalysis Today* 79–80, 169-179.
- V.K. Gupta, Suhas, Application of low-cost adsorbents for dye removal – A review, *Journal of Environmental Management*, 90 (2009) 2313-2342.
- Vasileva N., Godjevargova T. (2004) Study on the behaviour of glucose oxidase immobilized on microfiltration polyamide membrane. *Journal of Membrane Science*. 239: 157-161.
- Villegas M., Vidaurre E.F., Habert A.C., Gottifredi J.C. (2011) Sorption and pervaporation with poly(3-hydroxybutyrate) membranes: methanol/methyl tert-butyl ether mixtures. *Journal of Membrane Science*. 367: 103-109.
- W. Peng and M. Imai, Food polymer pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane performed smart function both on mass transfer and molecular size recognition. *Desalination and Water Treatment*, 34 (2011), 239-245.
- Won W., Feng X.S., Lawless D. (2002). Pervaporation with chitosan membranes: separation of dimethyl carbonate/methanol/water mixtures. *Journal of Membrane Science*. 209: 493-508.
- Wu J., Yuan Q. (2002) Gas permeability of a novel cellulose membrane. *Journal of Membrane Science*. 204: 185-194.
- Wang W.P., Thomas S., Zhang X.L., Pan X.L., Yang W.S. and Xiong G.X., 2006. H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> gaseous mixture separation in dense Pd/ $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hollow fiber membranes: Experimental and simulation studies. *Sep. Purif. Technol.* 52, 177-185.
- Xiao Q., Lim L.T., Tong Q. Properties of pullulan-based blend film as affected by alginate content and relative humidity. *Carbohydrate Polymers*. 87: 227-234.
- Xiao S., Feng X.S., Huang R.Y.M. (2007). Trimesoyl chloride crosslinked chitosan

- membranes for CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> separation and pervaporation dehydration of isopropanol. *Journal of Membrane Science*. 306: 36-46.
- Yamazaki.E.,Osamu.Kurita., Yasuki.Matsumur. (2008). Hydrocolloid from leaves of corchorusolitorius and its synergistic effect on k-carrageenan gel strength. *Food Hydrocolloids* 22, 819-825.
- Y. Sanchuan, L. Meihong, M. Miao, Q. Ming, L. Zhenhua, G. Congjie, Impacts of membrane properties on reactive dye removal from dye/salt mixtures by asymmetric cellulose acetate and composite polyamide nanofiltration membranes, *Journal of Membrane Science*, 350 (2010) 83-91.
- Yushina Y. & Hasegawa J. (1994). Process performance comparison of membrane introduced anaerobic digestion using food industry waste water. *Desalination*. 98: 413-421.
- Yaroshchuk A.E. (1995) Solution-diffusion-imperfection model revised. *Journal of Membrane Science*. 101: 83-87.
- Zeng X.F., Ruckenstein E. (1998) Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations. *Journal of Membrane Science*. 148: 195-205.
- Zio A.D., Prisciandaro M., Barda D. (2005) Disinfection of surface waters with UF membranes. *Desalination*. 179: 297-305.
- Zheng X., Liu J. (2006) Dyeing and printing wastewater treatment using a membrane bioreactor with a gravity drain. *Desalination*. 190: 277-286.
- Zou H.F., Lou Q.Z. and Zhou D.M., 2001. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 199-240.
- 古崎新太郎、今井正直、化学工学のフロンティア バイオ生産物の分離工学、培風館 (1999)。
- 海野肇、中西一弘、丹治保典、今井正直、養王田正文、荻野博康、生物化学工学 (第三版)、講談社 (2011)。
- 高橋智輝、N-アセリル化キトサンの高分子特性の制御と機能解析、崇城大学博士論文 (2008)。
- 加島敬太、アルギン酸ネットワークによる高度分離膜の創成と架橋高分子論に基づく分子分画機能の制御、日本大学、博士論文 (2012)。
- キチン、キトサン研究会編、キチン、キトサンハンドブック、技術堂 (1995)

## 本論文に関する研究業績

### 原著論文（査読あり）（2件）

1. Peng Wu and Masanao Imai (2011): **Food polymer pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane performed smart function both on mass transfer and molecular size recognition.**  
*Desalination and Water Treatment*, 34, 239-245.
2. Peng Wu and Masanao Imai (2013): **Excellent dyes removal and remarkable molecular size rejection of novel biopolymer composite membrane.**  
*Desalination and Water Treatment*, 51, 5237-5247.

### 著書（1件）

1. Peng Wu and Masanao Imai (2012): **Novel biopolymer composite membrane involved with selective mass transfer and excellent water permeability.**  
*Advancing Desalination*, InTech Pub., Chapter 3, 51-81.

### その他の刊行物（3件）

1. Peng Wu and Masanao Imai (2012): **Outstanding molecular size recognition and regulation of water permeability on  $\kappa$ -carrageenan-pullulan membrane involved in synergistic design of composite polysaccharides-structure.**  
*Procedia Engineering*, 42, 1313-1325
2. 呉鵬 (2011): 国内外で活躍する化学工学出身者（留学体験記）.  
化学工学創立 75 周年記念増刊号, 75, 209（社）化学工学会.
3. 呉鵬、今井正直(2013): 食品由来の構造多糖類における糖鎖ネットワーク制御によるアフィニティー高度分離膜の開発.  
平成 24 年度年報, 28, 280-285, (財)飯島藤十郎記念食品科学振興財団.



## 国際会議 (9 件)

1. Peng Wu and Masanao Imai, **Preparation of pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane and evaluation of mass transfer**. 15th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC). PP-F-15, (Xiamen, Fujian, China). Dec. 18-20 (2009), Poster.
2. Peng Wu and Masanao Imai, **Food polymer pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane performed smart function both on mass transfer and molecular size recognition**. The 6th conference of the Aseanian Society (AMS6) in conjunction with the 7<sup>th</sup> International Membrane Science and Technology Conference. P-484, (Sydney, Australia). Nov. 22-26 (2010), Poster.
3. Peng Wu and Masanao Imai, **Capability of molecular size screening on crosslinked pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane and its characterization regarding to polymer network analysis and practical mass transfer processing**. The 2nd International Symposium on Process Chemistry (ISPC2011). 2P-44, (Kyoto, Japan). Aug. 10-12 (2011), Poster.
4. Peng Wu and Masanao Imai, **Attractive Potential of Marine Biopolymer for Composite Membrane involved with Selected Separation by Desired Networks Achieved Molecular Size Recognition**. 14th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE2012). 449, (Singapore) Feb. 21-24 (2012), Oral.
5. Peng Wu and Masanao Imai, **Excellent dyes removal and remarkable molecular size rejection of novel biopolymer composite membrane**. The 7th Conference of Aseanian Membrane Society (AMS7). OR\_S1\_423,(Busan, Korea) Jul. 4-6 (2012), Poster.

6. Peng Wu and Masanao Imai, **Desirable Synergetic Network of  $\kappa$ -Carrageenan and Pullulan to Create Marine Polymer Based Membrane: An Excellent Molecular Permeation and Sufficient Mechanical Strength.** The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2012). P-017, (Kochi, Japan). Jul. 13-16 (2012), Poster.
7. Peng Wu and Masanao Imai, **Outstanding molecular size recognition and regulation of water permeability on  $\kappa$ -carrageenan-pullulan membrane involved in synergistic design of composite polysaccharides-structure.** 20th International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2012). C7-3, (Prague, Czech Republic). Aug. 25-29 (2012), Oral.
8. Peng Wu and Masanao Imai, **Characterization of protein ultra-filtration through surface modified various molecular weight chitosan membrane which binding Cibacron Blue F3GA as affinity ligand.** The 8th Conference of Aseanian Membrane Society. O-B-08, (Xi'an, China). Jul. 16-19 (2013), Oral.
9. Peng Wu and Masanao Imai, **Regulation of Surface Roughness of Chitosan Membrane By Silica Micro-particles and Improvement of Mass Transfer Flux.** 9th World Congress of Chemical Engineering (WCCE2013). Th0-T116A-5 (Seoul, Korea). Aug. 18-23 (2013), Oral.

## 日本国内学会 (10 件)

1. 呉鵬, 陶慧, 今井正直, 鈴木功, プルランを中心成分とする架橋高分子膜の調製と物性評価, 化学工学会米沢大会(3 支部合同大会), (米沢市, 山形県), C118, 2009 年 8 月 10-11 日, 口頭発表.
2. 呉鵬, 陶慧, 今井正直, 鈴木功, 生体高分子  $\kappa$ -カラギーナン・プルラン複合膜の調製と物質透過流束の評価, 分離技術会年会, (東京), S8-06P, 2010 年 6 月 2-3 日, ポスター発表.
3. 呉鵬, 陶慧, 今井正直, 食品由来の高分子である  $\kappa$ -カラギーナン・プルランを用いた複合膜の調製と分子分画, 日本食品工学会第 11 回年会, (東京), 2C10, 2010 年 8 月 5-6 日, 口頭発表.
4. 呉鵬, 陶慧, 今井正直, 架橋剤グルタルアルデヒドを用いて  $\kappa$ -カラギーナンを複合天然高分子機能膜と分離特性解明, 化学工学会第 42 回秋季大会, (京都), V118, 2010 年 9 月 6-8 日, 口頭発表.
5. 呉鵬, 陶慧, 今井正直, 架橋プルランと  $\kappa$ -カラギーナンの糖鎖構造の制御と複合膜の透過特性, 分離技術会年会, (東京), S7-P7, 2011 年 6 月 3-4 日, ポスター発表.
6. 呉鵬, 陶慧, 今井正直, プルラン- $\kappa$ -カラギーラン複合膜の糖鎖ネットワークの制御による分子分画性能の設計, 日本食品工学会第 12 回年会, (東京), 5-2A-7, 2011 年 8 月 5-6 日, 口頭発表.
7. 呉鵬, 陶慧, 今井正直, 架橋されたプルラン糖鎖と  $\kappa$ -カラギーナンネットワークの協同効果による膜分離機能の構築, 化学工学会第 43 回秋季大会, (名古屋), O304, 2011 年 9 月 14-15 日, 口頭発表.

8. 吳鵬, 陶慧, 今井正直, 構造的な多糖類による複合膜の形成と膜内ネットワークによる分子分画, 第43回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, (名古屋), 2J14, 2012年11月10-11日, 口頭発表.
9. 吳鵬, 陶慧, 今井正直, 生体高分子複合膜の新規調製と糖鎖ネットワーク制御による水溶性色素分子の選択分離, 化学工学会第78年会, (大阪), Q314, 2013年3月17-19日, 口頭発表.
10. 吳鵬, 陶慧, 今井正直, シリカ微粒子による表面改質を施した新規 **affinity** 膜の創製とタンパク質並びに水の透過特性, 日本食品工学会第14回年次大会, (京都), 3-1P-34, 2013年8月9-10日, ポスター発表.

#### 研究会等 (1件)

1. 吳鵬, 陶慧, 今井正直, 天然高分子プルラン・κ-カラギーナン複合機能膜の物質認識能と純水透過流束の評価, 第21回新機能化学工学研究会, (東京), 2011年1月9日, 口頭発表.

#### 研究助成金 (取得) 実績

1. 平成23年度 財団法人飯島藤十郎記念財団食品科学振興財団外国人留学生研究助成金 (90万円) (期間: 2012年4月から2013年3月まで)

#### 授賞歴

1. 平成22年8月19日日本食品工学会第11回年次大会 優秀口頭発表賞

#### 研究奨励制度 (採用) 実績

1. 平成23年度 日本大学生物資源科学部 特別研究生 (博士後期課程1年)
2. 平成24年度 日本大学生物資源科学部 特別研究生 (博士後期課程2年)
3. 平成25年度 日本大学生物資源科学部 特別研究生 (博士後期課程3年)

## 謝 辞

本論文は、日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻 博士前期課程並びに博士後期課程において、食品生命工学研究室に在籍した 2009 年 4 月から 2013 年 3 月までの 5 年間に行った研究成果をまとめたものであります。

ここでは、本研究が遂行された食品生命工学研究室における私の研究生活を振り返るとともに、私の研究生活を支えていただいた多くの方々への感謝の意を表したいと思えます。

終始暖かいご指導と激励を賜りました日本大学大学院 生物資源科学研究科 今井正直教授（本論文の主査）には深く感謝を申し上げます。研究室に入室した当初、今井先生は留学生の私が研究を進めるにあたり、必要な基礎知識（化学工学や物理化学など）を講じていただきました。初めて今井先生の講義を聴講して、自分の学生時代の中で最も深い感銘を受けました。今井先生の講義は学問に対する熱烈な好学心をひしひしと私の胸に感じさせ、私の学問や研究への情熱を知らず知らずに掻き立てられ、自然科学への探求心や自然科学への愛情を私に吹き込むようなものでありました。これは講義の事実的な内容よりもはるかに有意義なことでありました。心より御礼を申し上げます。

今井先生には実験データを考察する上で単にグラフ上に反映された現象的な結果を見るだけでなく、それらの実験データを様々な視点から鋭く読み取る考察力を養って頂きました。これにより化学工学的な視点と、それに私は目覚めることができました。

研究室の学生の皆さんに行き届いている学風は先生の感化によって、育まれていることを、長年のお付き合いによって会得することができました。本当に今井先生の傍で勉強できたことは私の人生において掛け替えのない幸福と誇りであります。心より御礼を申し上げます。洵にありがとうございました。

日本大学大学院 生物資源科学研究科 小田宗宏教授には、本論文の副査のご承引を賜りました。学位審査において、膜調製時高分子溶液の pH 並びに膜の機械的特性並びに透過特性における pH 測定の重要性など貴重なご助言を頂きました。頂戴した貴重なご意見は、今後の製膜時の留意点と研究展開に活かしたいと思います。心より御礼を申し上げます。洵にありがとうございました。

日本大学大学院 生物資源科学研究科 松宮政弘教授には、本論文の副査の

ご承引を賜りました。学位審査において、小さい分子量のアミノ酸類などによる chitosan 膜の分離性能の証明、また本研究で提案した多段膜分離プロセスの上流側に chitosan 膜を設置する理由になる重要なパラメーターなどの貴重なご意見を賜りました。今後、多段膜分離プロセスの実現に向けて、重要な観点だと思えます。心より感謝を申し上げます。洵にありがとうございました。

日本大学名誉教授の鈴木功先生には、2009 年教授として在任中に私費留学生の私を快く受け入れて頂きました。先生のご承引なくして私の日本留学は実現しませんでした。留学開始後、時に細やかなご配慮を頂きましたことを感謝申し上げます。また、学会や本研究室の OB 会などにて多方面にご助言を頂き、暖かく見守って頂いたことは留学生の私に対する優しさであり、心より御礼を申し上げます。洵にありがとうございました。

日本大学 生物資源科学部 陶慧専任講師には、研究室の器具や装置の取り扱い方を始め、研究室生活のアドバイスをして頂きました。総合研究所の SEM 操作では特にお世話になりました。心より感謝しております。洵にありがとうございました。

東京大学名誉教授の古崎新太郎先生には、学会や研究会において、貴重なご意見と励ましのお言葉を賜りました。先生ご自身が若い頃にアメリカに留学経験があり、言葉や文化の異なる国でご苦労された経験から、私に対して常にお心に懸けて頂き、学会活動など貴重な情報を折々に賜りました。先生個人の深い思いに触れたことは私の感激です。洵にありがとうございました。

古崎和子様には、英語発音や英語を使うコミュニケーション術など献身的にご指導を賜りました。また、常に視野を海外に向け、国籍に関係なく英語をツールとして人間関係の構築、並びに豊かなコミュニケーションができる心掛けの重要性と実践への励ましを賜りました。心より感謝しております。洵にありがとうございました。

奈良工業高等専門学校直江一光准教授には、学会や研究会参加の折にご指導とご助言を賜りました。心より感謝致します。また、先生の研究室に在籍されていた山中幸一郎さんには、学会などでご一緒させて頂き、たくさん楽しい思い出を作りました。洵にありがとうございました。

神戸大学の高橋智輝先生には、学会や研究参加の折に、生体高分子を用いた膜科学の観点からご指導を賜るとともに、研究展開に関する相談に乗って頂きました。心より感謝しております。洵にありがとうございました。

東京理科大学 工学部 工業化学科の大竹勝人教授、庄野厚教授、筑波大学 大学院 生命環境科学研究科の市川創作教授、東京都市大学 工学部の黒岩崇准教授、日本水産株式会社の山崎圭樹博士の諸先生方には、学会や研究会などで折々にご指導を賜り、日頃より励ましとご好意を頂いておりました。心より感謝しております。洵にありがとうございました。

小山工業高等専門学校に加島敬太助教には、私は博士前期課程 1 年に入学した当時から、私の一学年上の先輩として高分子膜研究の進み方から実験の手法まで献身的にお世話を頂きました。私にとって最も親しい学友であり、研究上の悩みや日常の思いについてもいつも熱心に耳を傾けてくださいました。高分子膜の研究に対する独創性や柔軟性を常に発揮し、自分の研究を将来のイノベーションに繋ごうとする積極的な姿勢に、研究室で隣に座っていた私は常に刺激され、励まされておりました。この大切な経験は今後の研究の糧となり力になると信じております。心より感謝しております。洵にありがとうございました。

青木太祐さん（ケミ・コム・ジャパン株式会社）は、1 年間大学院で一緒に勉強させて頂きました。博士前期課程修了後も公私ともに親しくさせて頂き、心より感謝しております。洵にありがとうございました。

また、私と同期に博士前期課程を修了された白川芳枝さん（現在東洋合成工業株式会社）は、2 年間一緒に勉強させて頂きました。博士前期課程修了後も公私ともに親しくさせて頂いております。心より感謝しております。洵にありがとうございました。

博士後期課程 2 年生の納谷昌和さんは、私が博士前期課程 2 年から 4 年間勉強させて頂きました。前向きな研究姿勢と紳士的な振る舞いは教えられることが多いです。また、研究室生活において、多くのご助力を賜りました。心より感謝しております。洵にありがとうございました。

博士後期課程 1 年生の中山良一さんは、私が博士前期課程に在学していた時の同期であり、修了に一旦就職されましたが、本年（2013 年）の 4 月から、博士後期課程に入学しました。更なる高度な学問を追求する決心には大いに尊敬致します。博士後期課程に入学後、国内外の学会に積極的に参加し、原著も公刊されるなど、社会人 2 年間を経て来たからこそ、得られるアクティビティーと思います。社会人の経験者として新鮮なご意見を頂いております。洵にありがとうございました。

また、私の在学中に食品生命工学研究室のメンバーとしてご一緒した博士前期課程 2 年の野本竜平さんと田村健太郎さんにはいつも研究室内で元気づけられました。博士前期課程 1 年の児玉尚大さんと早乙女義明さんのこれからの大いにご期待致します。また、多くの学部卒業生各位から私の日本留学の楽しい思い出を沢山頂きました。心から感謝を申し上げます。

本研究遂行にあたり、業者並びに職員各位の職務を超えて御厚意により、日常の研究生活が支えられたことも、忘れ難い思い出となります。改めて、篤く御礼を申し上げます。また、日本大学大学院に在籍していた 5 年間に、日本大学や日本の企業・財団（独立行政法人日本学生支援機構、三菱商事株式会社、公益財団法人飯島藤十郎記念食品科学振興財団、公益信託大槻記念アジア・アフリカ留学生奨学基金）から経済的にご支援を賜り、私費で留学した私はアルバイトに従事することなく、無事に博士課程まで進学することができました。日本人の公正な評価が私に寄せられていなければ、私は日々の学業に専念することができませんでした。日本の方々の一貫した私へのご支援に心から感謝しております。

私は中国と日本の両国において自分の青年期を過ごすことができるお手配を多くの方々のご理解とご支援により続けることができたことを大変嬉しく、かつ大変誇りに思います。その恩返しとして、将来は中日両国の文化因子の伝達者として、専門分野を通じ、あるいは日常の触れ合いを通じて親善と友好に努めることをお誓い致します。洵にありがとうございました。

最後に、これまで自分の思う道を進むことに対し、健在で暖かく見守り続け、いつも心の支えになってくれた中国にいる両親と日本にいる親族に心より感謝します。そして、私と結婚しているにもかかわらず、海を境にして一緒に生活できることがなくても 5 年間応援し続けてくれる素晴らしい妻の蘇艶君に心より感謝します。洵にありがとうございました。

2013 年（平成 25 年）12 月 29 日



## 原著論文並びに著書、その他の刊行物

### 原著論文（査読あり）（2件）

1. Peng Wu and Masanao Imai (2011): **Food polymer pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane performed smart function both on mass transfer and molecular size recognition.**  
*Desalination and Water Treatment*, 34, 239-245.
2. Peng Wu and Masanao Imai (2013): **Excellent dyes removal and remarkable molecular size rejection of novel biopolymer composite membrane.**  
*Desalination and Water Treatment*, 51, 5237-5247.

### 著書（1件）

1. Peng Wu and Masanao Imai (2012): **Novel biopolymer composite membrane involved with selective mass transfer and excellent water permeability.**  
*Advancing Desalination*, InTech Pub., Chapter 3, 51-81.

### その他の刊行物（3件）

1. Peng Wu and Masanao Imai (2012): **Outstanding molecular size recognition and regulation of water permeability on  $\kappa$ -carrageenan-pullulan membrane involved in synergistic design of composite polysaccharides-structure.**  
*Procedia Engineering*, 42, 1313-1325
2. 呉鵬 (2011): 国内外で活躍する化学工学出身者（留学体験記）.  
化学工学創立 75 周年記念増刊号, 75, 209（社）化学工学会.
3. 呉鵬、今井正直(2013): 食品由来の構造多糖類における糖鎖ネットワーク制御によるアフィニティー高度分離膜の開発.  
平成 24 年度年報, 28, 280-285, (財)飯島藤十郎記念食品科学振興財団.



## Food polymer pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane performed smart function both on mass transfer and molecular size recognition

Peng Wu, Masanao Imai\*

Course in Bioresource Utilization Sciences, Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon University 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa-pref. 252-0880, Japan

Tel./Fax: +81-466-84-3978; email: XLT05104@nifty.com

Received 3 September 2010; Accepted 3 January 2011

### ABSTRACT

Biopolymer pullulan (P) can be cross-linked easily by glutaraldehyde, and additive  $\kappa$ -carrageenan ( $\kappa$ C) completes an attractive combination for increasing tensile strength sufficiently for practical use. In this study, the  $\kappa$ -carrageenan mass fraction ( $F_c$ ) was defined as  $F_c \equiv (\kappa C[g]/(P[g] + \kappa C[g]))$  and was set at 0.33, 0.50, 0.66, and 0.83. Composite membranes were successfully prepared in our experiment  $F_c$  ranges by the casting method. The maximum stress and strain, water content, mass-transfer characteristics, and pure water permeability were demonstrated to be a function of the added cross-linker glutaraldehyde. Increasing the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan enhanced the maximum stress and the maximum strain at break, suggesting that pullulan imparts flexibility and the  $\kappa$ -carrageenan imparts stiffness to the composite membranes. The mass-transfer characteristics were analysed based on changes in the effective diffusion coefficient in the composite membranes. Some water-soluble marker components were employed to estimate the size of the mass-transfer channel in the composite membranes. The reference molecular size was from 60 to 826Da, indicating Urea, Methyl Orange, Indigo Carmine, Bordeaux S, and Brilliant Blue. The effective diffusion coefficient was dramatically changed by a factor of 26,000 for  $F_c$  0.66, even though the molecular weight of the reference only changed by a factor of 14. The  $F_c$  value significantly controls not only the mechanical strength but also the molecular size recognition of the membrane. A large dependence on the molecular size was achieved by specific polymer frame-works using the excellent combination of pullulan and  $\kappa$ -carrageenan.

*Keywords:* Pullulan;  $\kappa$ -Carrageenan; Mechanical strength; Effective diffusion coefficient; Composite membrane; Water permeability

### 1. Introduction

Biomass is a renewable class of materials of growing interest among researchers in the quest to achieve global sustainability. Biopolymers are a representation of the biomass, in particular starch and cellulose. In recent years, studies on edible films have intensified [1–2]. The potential benefits of these films lie in both their bio-compatible characteristics and relatively

low cost. Edible films are primarily composed of polysaccharides, proteins, and lipids, alone or in combination. Such films are an effective barrier for preventing unwanted mass transfers in foods (e.g., water vapor and oxygen transmission), thereby improving their quality and extending their shelf life [3–5]. Composing polysaccharides in the form of blends with varying ratios of polymers offers the possibility of creating different films with improved characteristics.

Pullulan (P) is a water-soluble microbial polysaccharide with excellent film-forming properties. Its films are

\*Corresponding author.

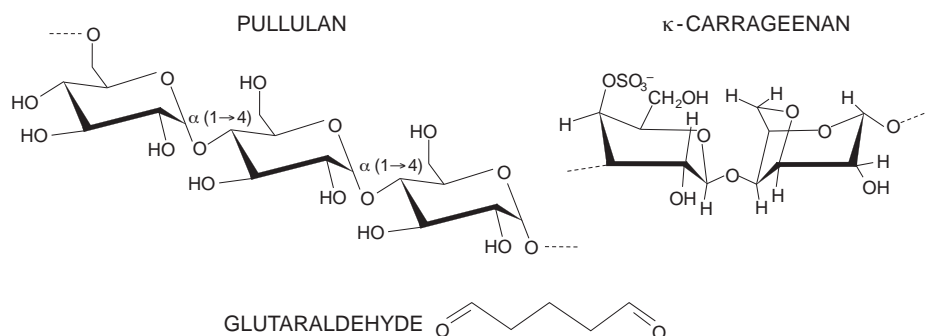


Fig. 1. Molecular structure of pullulan,  $\kappa$ -carrageenan, and glutaraldehyde, as used in this study.

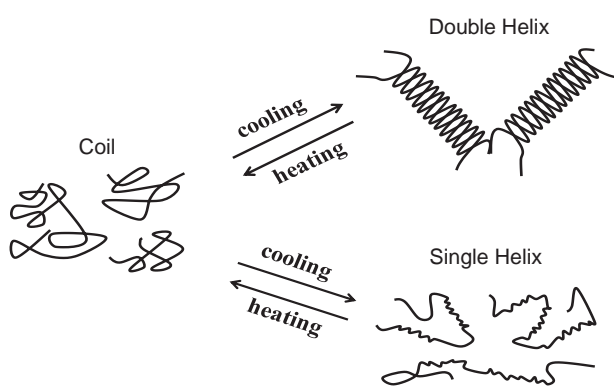


Fig. 2. Two models of the conformational transition of  $\kappa$ -carrageenan.

colorless, tasteless, odorless, transparent, flexible, highly impermeable to oil and oxygen, and heat-sealable. Pullulan is an exocellular homopolysaccharide produced by the fungus *Aureobasidium pullulans*. It is a linear mixture of  $\alpha$ -D-glucan consisting mainly of maltotriose repeating units interconnected by  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) linkages. The regular alternation of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) bonds results in distinctive structural flexibility and enhanced water-solubility [6–8].

Carrageenan is water-soluble polymers extracted from red algae. They are used in the food and pharmaceutical industries as gelling and stabilizing agents and for microencapsulation and immobilization of drugs and enzymes. Carrageenan consist of alternating copolymers of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactose and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-3, 6-anhydro-D or L-galactose [9]. Several isomers of carrageenan are known as  $\kappa$ -,  $\lambda$ -, and  $\iota$ -carrageenan; they differ in the number and positions of ester sulfate groups on the repeating galactose units.  $\kappa$ -Carrageenan ( $\kappa$ C) has only one negative charge per disaccharide and tends to form a strong and rigid gel. Carrageenan also undergoes a thermo-reversible ion-induced conformation transition from a disordered (coil) to an ordered (helix), and these transitions are both temperature- and

concentration-dependent. At temperatures below its transition temperature,  $\kappa$ -carrageenan assumes a helical configuration between polymer strands, forming a more rigid structure. These transitions from coil to helix have been observed by many researchers. Several investigators favour the coaxial double helix as the fundamental ordered conformation. Upon reducing the temperature or increasing the salt concentration, double-helical stretches will be formed in a thermo-reversible process. Other groups of researchers have presented evidence of the single helix as the fundamental ordered state of carrageenan prior to association and gel formation. The two kinds of molecular structure thought regarding the conformation transition of  $\kappa$ -carrageenan are illustrated in Fig. 2 [10–15]. Whether it is a single or double helix, the structure becomes more rigid in the helical conformation, as seen in the figure.

Water-soluble glutaraldehyde was chosen as the cross-linking agent because of its ability to facilitate the formation of linkages from hydroxyl groups [16–17]. Crosslink of pullulan with glutaraldehyde involves the reaction of the  $-OH$  radical of pullulan with the aldehyde groups of the glutaraldehyde. The chemical structures of pullulan,  $\kappa$ -Carrageenan, and glutaraldehyde are shown in Fig. 1.

This paper describes the preparation and mass-transfer characteristics of a pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane. A composite membrane made from natural polymers was successfully prepared by the casting method. The membrane was clearly recognized to be an attractive combination of sufficiently elevated tensile strength for conventional applications and to possess a molecular-size screening effect.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Pullulan (MW 60,000–240,000Da) was provided by Hayashibara Biochemical Laboratory (Okayama, Japan).  $\kappa$ -carrageenan (MW 500,000Da) and glutaraldehyde

(MW 100.12Da) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Urea (MW 60.06Da), Methyl Orange (MW 327.34Da), and Bordeaux S (MW 604.48Da) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Brilliant Blue (MW 826.0Da) was purchased from Sigma Chemical Co. (Perth, WA). Indigo Carmine (MW 466.37Da) was purchased from Kokusan Chemical Works, Ltd. (Tokyo, Japan).

## 2.2. Preparation of pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane

Pullulan and  $\kappa$ -carrageenan were dissolved in distilled water (70°C) using a magnetic stirrer to prepare film-forming solutions of various blend-weight ratios. All polymer solutions were prepared based on 3 g total polymer weight dissolved in 100 ml of distilled water at 70°C for one hour. In addition, each was stirred for one hour at 70°C with cross-linker glutaraldehyde added. The polymer solutions were then cast onto petri dishes, followed by drying in an electrical blast-drying chest at 65°C for 24 h. The dried membranes (attached to the petri dishes) were immersed in distilled water for one hour. The swollen membrane was spontaneously peeled from the petri dish at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  for further testing. Membrane samples were tested in triplicate.

In our studies, the glutaraldehyde added pullulan- $\kappa$ -carrageenan solution was dispensed to the petri dishes and then put a part of ones in desiccators to be dried at room temperature ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 1 week, the others were dried in an electrical blast-drying chest at 45°C, 65°C, 85°C respectively for 24 h. As you can see in Fig. 3.

One sample dried at room temperature ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 1 week and relatively-low temperature (45°C) for 24 h

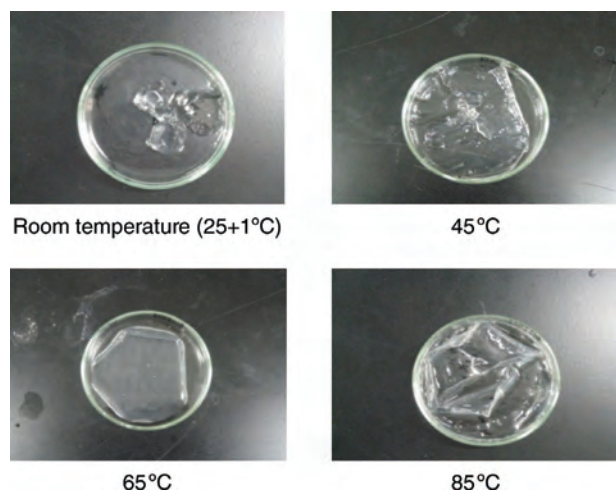


Fig. 3. The crosslinking states of pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane after drying at different temperatures. (GA 70 mM,  $F_C$  0.33).

with very low crosslinking tend to be weak and flexible, whereas another sample dried at over high temperature with high degree of crosslinking are too hard and rigid to experiment. Therefore, we chose 65°C for drying our composite membrane, and it performed excellent formation of the composite membrane for our studies. Thereafter, we could assume that crosslinking almost be taking place during drying at high temperature. Incidentally, authors cannot observe the phenomenon of gelation when the glutaraldehyde added during membrane preparation at 70°C.

## 2.3. Mechanical strength and elastic characteristics

A rheometer (CR-DX500, Sun Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used to determine the tensile strength and the percentage elongation at the break. Three rectangular-strip specimens (10 mm wide, 40 mm long) were cut from each membrane for tensile testing. The initial grip separation was set to 20 mm, and the cross-head speed was set to 1 mm/s. The initial membrane thickness was measured using a micrometer (Mitutoyo, Kanagawa, Japan). The average thickness of the membrane strip was used to estimate the initial cross-sectional area of the membrane sample.

## 2.4. Measurement of mass-transfer flux

The concentration of the solution transported through the membrane in regular time is required to estimate the mass-transfer characteristics of the membrane. Diffusion is a fundamental phenomenon in several physical and chemical processes, representing the natural movement of neutral or charged species in solution. The diffusion coefficient in liquid is an important parameter in understanding the complex processes of mass transfer. There are several empirical methods for estimating the diffusion coefficient in aqueous phase that consider infinite dilution and are based on molecular-size indicators. This paper introduces one of these methods as follows:

$$\text{Wilke \& chang, } D_w = \frac{1.86 \times 10^{-18} (\phi_B M_w)^{0.5}}{\mu_w \nu_A^{0.6}} T \quad (1)$$

where  $D_w$  is the diffusion coefficient of the solute in water [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ],  $\mu_w$  is the viscosity of water [Pa s], and  $[K]$  is the association factor for solvent B at the required temperature  $T$  (for water,  $\phi_B=2.6$ ).  $M_w$  is the molar mass of water [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ], and  $\nu_A$  is the molar volume of solute A at the normal boiling point [ $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ].

The mass-transfer setup in our experiment is illustrated in Fig. 4. The membrane was sandwiched between two equal-volume compartments. The compartments

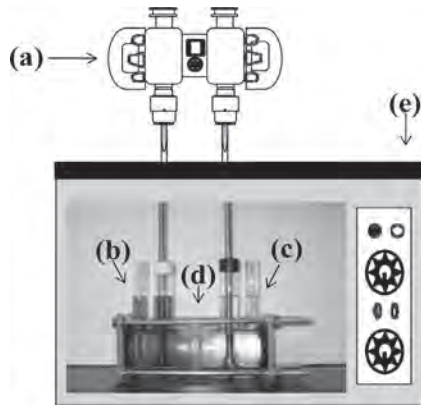


Fig. 4. Schematic diagram of the mass-transfer setup in our experiment. (a) Agitating motor, (b) Mass-transfer cell (feed side), (c) Mass-transfer cell (stripping side), (e) Membrane, (d) Constant temperature water tank (303 K).

had a volume of 200 ml and an effective membrane area of 0.24 m<sup>2</sup>. The feed compartment was filled with water-soluble marker components (Urea, Methyl Orange, Indigo Carmine, Bordeaux S, Brilliant Blue) in solution (190 ml), and the stripping compartment was filled with distilled water (190 ml). During the experiment, the two compartments of solutions were stirred at a constant speed (850 min<sup>-1</sup>) in order to minimize the mass-transfer resistance of the soluble boundary layer above the membrane. Samples were taken from the two compartments at regular time intervals of 30 to 60 min. The sample concentration of the samples was analysed with a spectrophotometer (UV Mini 1240, Shimadzu). It is supposed that since the concentrations in the two compartments were uniform, the mass-transfer flux was so small that the diffusion process can be regarded as a quasi-steady state. Accordingly, we can use Eqs. (2) and (3) to calculate the effective diffusion coefficients.

$$\ln \left( 1 - \frac{2C_s}{C_{fi}} \right) = -2 \frac{A}{V} K_{OL} t \quad (2)$$

$$K_{OL}^{-1} = k_{L1}^{-1} + k_m^{-1} + k_{L2}^{-1} \quad (3)$$

The film mass-transfer resistances  $k_{L1}^{-1}$  and  $k_{L2}^{-1}$  in the overall mass transfer resistance  $K_{OL}^{-1}$  can be neglected because of the sufficiently turbulent conditions in the two compartments during the experiment.  $K_{OL}^{-1}$  did not depend on the stirring rate, therefore it directly indicates the membrane mass-transfer coefficient ( $k_m = Deff \cdot l^{-1}$ ). The effective diffusion coefficient in the membrane ( $Deff$ ) was evaluated from  $k_m$ . The initial membrane thickness  $l$  in the swollen state was measured with a micrometer.

## 2.5. Water content

Swelling of the cross-linked membranes was measured using distilled water as the swelling medium in order to determine the degree of cross-linking achieved with the glutaraldehyde concentration. In general, a lower degree of swelling has been attributed to a higher degree of cross-linking.

Membranes were immersed in distilled water for 24 h at 25 ± 1°C. The swollen membranes were then placed between two dry filter papers to remove residual water from the membrane surface and weighed. After being dried at 65°C for 24 h, the dried membrane was re-weighed. The water content of the membrane was calculated using Eq. (4):

$$\text{Water Content } (W_t \%) = \frac{w_s - w_d}{w_s} \quad (4)$$

Where  $w_s$  is the mass of the swollen membrane, and  $w_d$  is that of the dried membrane.

## 2.6. Pure-water permeability

The pure-water permeability of the membranes was measured under steady-state conditions. Prior to the experiments, the membrane was immersed in pure water for 12 h and was then installed into the pure-water permeability set-up.

The pure-water permeability experiment used an ultra-filtration cell with a volume of 200 ml and an effective filtration area of 0.21 m<sup>2</sup>. A pressure regulator valve was installed between the filtration cell and the pump in order to monitor the variation in applied pressure during filtration. A magnetic stirring bar was installed at the upper surface of the membranes but not attached to the membrane. Operational pressure was adjusted by a nitrogen gas. A petri dish was set in electronic balance to collect the permeated water from the ultra filtration cell. The mass of permeated water with aging variation was accurately measured based on the indication of the electronic balance.

A schematic representation of the module and setup is presented in Fig. 5. The pure-water permeability experiment was conducted at different pressures using the following equation:

$$J_V = \frac{V_p}{A \Delta t} \quad (5)$$

where  $J_V$  is the water flux [ $\text{m}^3_{\text{water}} \cdot \text{m}^{-2}_{\text{memb.}} \cdot \text{s}^{-1}$ ],  $V_p$  is the volumetric amount of permeated water [ $\text{m}^3$ ],  $A$  is the membrane area [ $\text{m}^2$ ],  $l$  is the membrane thickness [ $\text{m}$ ], and is the sampling time [ $\text{s}$ ].  $J_V$  is the water-permeated flux per unit membrane thickness, defined as ( $J_V l^{-1}$ ) [ $\text{m}^3_{\text{water}} \cdot \text{m}^{-2}_{\text{memb.}} \cdot \text{m}^{-1}_{\text{thickness}} \cdot \text{s}^{-1}$ ].

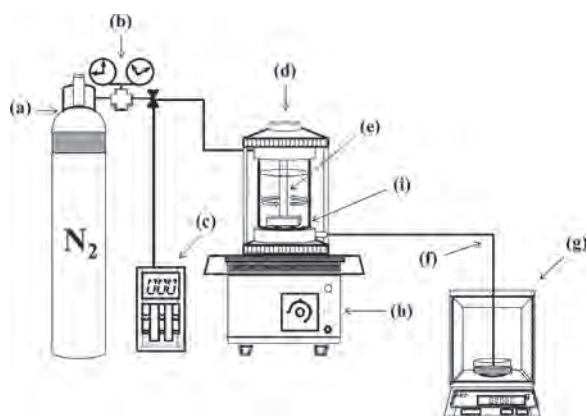


Fig. 5. Schematic diagram of filtration cell used to measure steady pure-water permeability through the membranes. (a)  $N_2$  gas, (b) Valve, (c) Transducer, (d) Filtration cell, (e) Magnetic stirring bar, (f) Pipe, (g) Electronic balance, (h) Magnetic stirrer, (i) Membrane.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Mechanical strength and elastic characteristics

It can be seen in Fig. 6 that the mechanical characteristics of the composite membranes in our experiment exhibited increasing strength (max. stress) and decreasing elongation (max. strain) as the glutaraldehyde level increased. The polymeric framework of the pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane became more densely populated with increasing glutaraldehyde concentration, and its mechanical strength was elevated. The mechanical stress increased with increasing glutaraldehyde concentration and then levelled off over 70 mM. In contrast, the mechanical strain gradually decayed with glutaraldehyde concentration.

Fig. 7 demonstrates that the increase in the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan increased the maximum stress and water content under the same cross-linking conditions. The mass fraction ( $F_C$ ) was defined as  $F_C \equiv (\kappa C[g]/(P[g] + \kappa C[g]))$ , depending on the addition of  $\kappa$ -carrageenan, the membrane strength continued to increase regardless of the water content. Moreover, the frame network of the composite membrane depends on both the concentration of the cross-linker and the mass fraction of the co-polymer. It is likely that swelling of the composite membrane increases the permeability.

#### 3.2. Measurement of mass-transfer flux

The mass-transfer characteristics were evaluated from the effective diffusion coefficient estimated by measuring the mass-transfer rate in the composite membrane. Water-soluble marker components were employed to determine the size of the transfer channel in the membrane. The reference molecular size was from

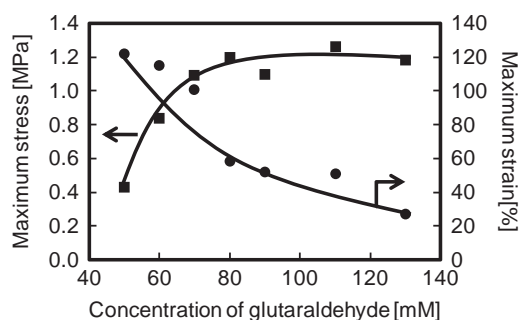


Fig. 6. Effect of additive glutaraldehyde concentration on the maximum stress and strain of prepared pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane.  $F_C$  was set at 0.33.

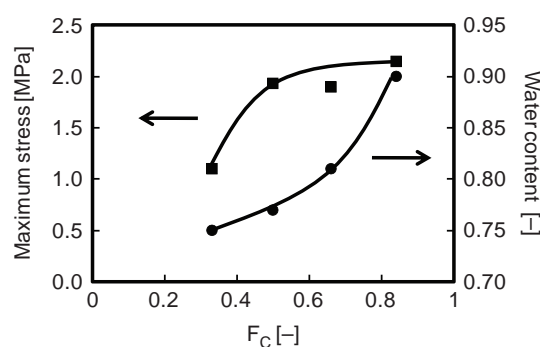


Fig. 7. Effect of the fraction of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ) on the maximum stress and water content on a pullulan- $\kappa$ -carrageenan membrane (GA 90 mM).


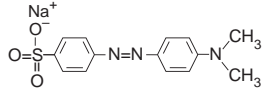
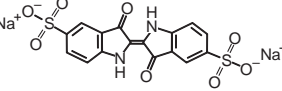
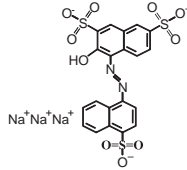
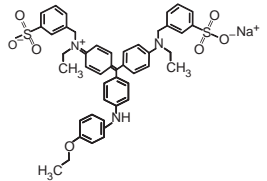
60 to 826Da indicating Urea, Methyl Orange, Indigo Carmine, Bordeaux S, and Brilliant Blue (Table 1).

The diffusion coefficient ( $D_w$ ) in bulk aqueous phase was estimated by Wilke & Chang's correlation (Eq. (1)). The effective diffusion coefficient in the membrane ( $D_{eff}$ ) was lower than  $D_w$  due to diffusion channels in the composite membranes (Fig. 8). The effective diffusion coefficient in the membrane  $D_{eff}$  dramatically changed, ranging within molecular weight by 26000-fold in a case where molecular weight only changed by 14-fold.

The effective diffusion coefficients of the components of lower molecular weight strongly depended on the  $\kappa$ -carrageenan fraction  $F_C$ . As it appears,  $D_{eff}$  evidently decayed under lower  $F_C$  conditions. The large dependence of  $D_{eff}$  on the  $F_C$  value suggests that the polymer frame-works become denser under lower  $F_C$  conditions. In the case of Bordeaux S, the change of effective diffusion coefficient with  $F_C$  was different from other tested chemicals'. The detail evaluation on mass transfer of Bordeaux S was necessary in future.

In addition, the steep change of the effective diffusion coefficient between Indigo Carmine and Bordeaux S in the each types of composite membrane was appeared. Authors therefore assumed that the size of the mass

Table 1  
Water-soluble model components

Model Components		MW [Da]	MS [Å]
A: Urea		60	6.0
B: Methylene Orange		327	10.6
C: Indigo Carmine		466	11.9
D: Bordeaux S		604	13.0
E: Brilliant Blue		826	14.4

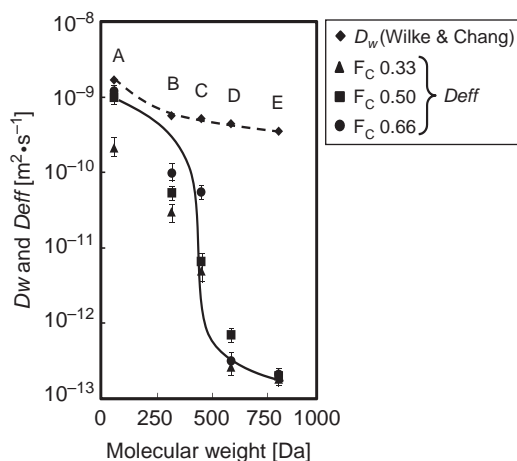


Fig. 8. Effect of molecular weight on the effective diffusion coefficient of a pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane. A: Urea (60Da), B: Methyl Orange (327Da), C: Indigo Carmine (466Da), D: Bordeaux S (604Da), E: Brilliant Blue (826Da).

transfer channel was almost equivalent to molecular size (approx.12) of Indigo Carmine, and it was suggested that mass transfer channel size was monodispersity.

### 3.3. Pure water permeability

The pure-water flux as a function of applied pressure was measured to investigate the stability and hydraulic properties of biopolymer composite membranes. In

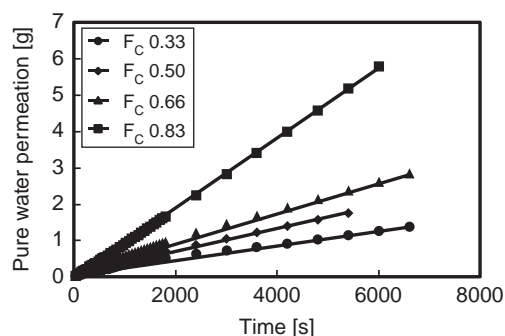


Fig. 9. Permeability of pure-water on pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane (GA 70 mM) over time. (298 K, 100 kPa).

Fig. 9, time course experiments were performed on four tested membranes ( $F_C$  0.33,  $F_C$  0.50,  $F_C$  0.66 and  $F_C$  0.83) at a constant concentration of the cross-linker glutaraldehyde (70 mM). The water flux of the composite membrane was calculated from the experimental curve. The volumetric water flux was recalculated using the density of the permeated water.

Fig. 10 depicts the relationship between the volumetric water flux and the operational acting on the membrane. The water flux increased almost linearly with increasing operational pressure. The permeability of the membranes increases in the following sequence:  $F_C$  0.83 >  $F_C$  0.66 >  $F_C$  0.50 >  $F_C$  0.33. Fig. 10 also illustrates that the water flux of the composite membrane was in primary proportion to the operational pressure, and it was suggested that the water flux of the composite membrane was obeyed by Hagen-Poiseuille flow.

It indicates that a higher mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan in the polymer concentration would lead to high water permeability. Based on the pure-water permeability results, we note that the higher mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan exhibits significant water flux compared to

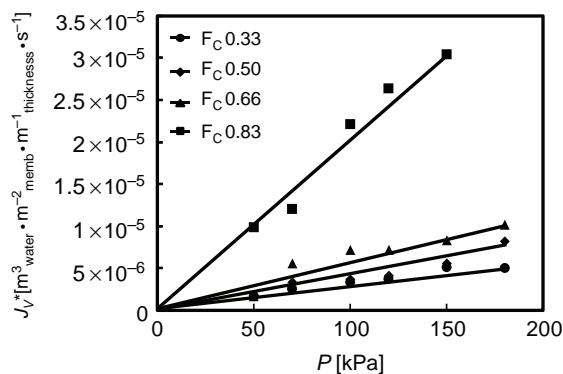


Fig. 10. Pure-water permeability of pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane (GA 70 mM) prepared from different mass fractions of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ) by applying different pressures.

the higher mass fraction of pullulan. The amount of the  $\kappa$ -carrageenan in the composite membrane performed noticeably high the water flux on the same pressure.

#### 4. Conclusions

Food polymer pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane was successfully prepared by the casting method. It has sufficient mechanical strength enough for a practical use and excellent mass transfer character especially on molecular size screening. The relationship between mass transfer character and the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan in the composite membrane was formulated based on the experiments of mass-transfer flux and pure water flux. The results provided a novel and simple method of preparation membrane and the size of mass-transfer channel based on molecular-size indicators, and suggested that different  $F_c$  values significantly affect the mass-transfer permeability. The water permeation flux as a function of applied pressure provided valuable technical information for investigating the stability and hydraulic properties of the composite membranes. It was concluded that pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane possessing a cross-linked hydrophilic structure performed high selectivity and high water flux. Thus, the mechanism of mass-transfer investigations is very useful and informative for the study and analysis of composite membrane.

#### Acknowledgement

The authors sincerely thank Dr. Kei Tao of Nihon University, who provided technical assistance with experimental operation and photography.

#### Symbols

$A$	—	Area of membrane [ $\text{m}^2$ ]
$C_{fi}$	—	Initial concentration of feed solution [M]
$C_s$	—	Concentration of stripping solution [M]
$D_w$	—	Diffusion coefficient in bulk aqueous phase [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$Deff$	—	Effective diffusion coefficient [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$J_V$	—	Water-permeated flux [ $\text{m}^3_{\text{water}} \cdot \text{m}^{-2}_{\text{memb.}} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$J_V^*$	—	Defined as ( $J_V^* = J_V \cdot l^{-1}$ ) [ $\text{m}^3_{\text{water}} \cdot \text{m}^{-2}_{\text{memb.}} \cdot \text{m}^{-1}_{\text{thickness}} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$K_{OL}$	—	Overall mass-transfer coefficient [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$K_{OL}^{-1}$	—	Overall mass transfer resistance [ $(\text{m} \cdot \text{s}^{-1})^{-1}$ ]
$k_m$	—	Membrane mass-transfer coefficient [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$k_{L1}$	—	Film mass-transfer coefficient in feed phase [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$k_{L2}$	—	Film mass-transfer coefficient in stripping phase [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$l$	—	Membrane thickness [m]

$\Delta P$	—	Operational pressure [kPa]
$\Delta t$	—	Time [s]
$T$	—	Temperature [K], defined by Eq. (1)
$V$	—	Volume of aqueous solution in the transfer cell presented in Fig. 4 [ $\text{m}^3$ ]
$V_p$	—	Permeated water through the membrane [ $\text{m}^3$ ]
$W_t$	—	Total water content ratio [%], defined by Eq. (4)
$w_s$	—	Initial mass of the swollen membrane [kg]
$w_d$	—	Mass of dried membrane [kg]

#### References

- [1] K. Openshaw, Biomass energy: Employment generation and its contribution, *Biomass and bioenergy*, 34 (2010) 365–378.
- [2] R. Chandra and R. Rustgi, *Biopolymer. Prog. Polym. Sci.*, 23 (1998) 1273–1335.
- [3] J.H. Han and G. Aristippos, *Edible films and coatings: A review. Innovations in Food Packaging* (2005) 239–262.
- [4] J.M. Krochta and C. De Mulder-Johnston, *Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities*, *Food Technol.*, 51 (2) (1997) 61–74.
- [5] A.C. Seydim and G. Saikus, *Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils*, *Food Res. Int.*, 39 (2006) 639–644.
- [6] S. Singh Ram, Gaganpreet K. Saini and John F. Kennedy, *Pullulan: Microbial sources, production and applications*, *Carbohydrate Polymers* 73 (2008) 515–531.
- [7] Barnett Christian, Alan Smith, Bernard Scanlon, Cleanthes J. Israilides, *Pullulan production by Aureobasidium pullulans growing on hydrolysed potato starch waste*, *Carbohydrate Polymers* 38 (1999) 203–209.
- [8] Sakata Yukoh and Makoto Otsuka, *Evaluation of relationship between molecular behaviour and mechanical strength of pullulan films*, *Int. J. Pharm.*, 374 (2009) 33–38.
- [9] L.V. Abad, H. Kudo, S. Saiki, N. Nagasawa, M. Tamada, H. Fub, Y. Muroya, M. Lin, Y. Katsumura, L.S. Relleve, C.T. Aranilla and A.M. DeLaRosa, *Radiolysis studies of aqueous  $\kappa$ -carrageenan*. *Nucl. Instrum. Methods in Phys. Res. B*, 268 (2010) 1607–1612.
- [10] Yamazaki, E, Osamu. Kuritaa and Yasuki Matsumur, *Hydrocolloid from leaves of corchorusolitorius and its synergistic effect on k-carrageenan gel strength*, *Food Hydrocolloids*, 22 (2008) 819–825.
- [11] M.R. Mangione, D. Giacomazza, D. Bulone, V. Martorana, G. Cavallaro and P.L. San Biagio, *K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> effects on the gelation properties of n-Carrageenan*. *Biophys. Chem.*, 113 (2005) 129–135.
- [12] J.V. deMelo, M.E. Bello, W.M. de Azeveã do, J.M. de Souza and F.B. Diniz, *The effect of glutaraldehyde on the electrochemical behavior of polyaniline*. *Electrochim. Acta*, 44 (1999) 2405–2412.
- [13] M.A. Hayat, *Glutaraldehyde: Role in electron microscopy*. *Micron and Microscopica Acta*, 17(2) (1986) 115–135.
- [14] Campo Vanessa Leiria, Daniel Fábio Kawano, Dilson Brazda Silva Jr. and Ivone Carvalho, *Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review*, *Carbohydr. Polym.*, 77 (2009) 167–180.
- [15] Kara Selim, Candan Tamerler, Hakan Bernek and Onder Pekcan, *Cation effects on sol-gel and gel-sol phase transitions of k-carrageenan-water system*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 31 (2003) 177–185.
- [16] A. Jayakrishnan and S.R. Jameelas, *Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices*. *Biomaterids*, 17 (1996) 471–484.
- [17] Vospernik Matevž, Albin Pintar, Gorazd Bercic and Janez Levac, *Mass transfer studies in gas-liquid-solid membrane contactors*, *Catal. Today*, 79–80 (2003) 169–179.





## Excellent dyes removal and remarkable molecular size rejection of novel biopolymer composite membrane

Peng Wu, Masanao Imai\*

Department of Bioresource Utilization Sciences, Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa-pref. 252-0880, Japan

Tel. +81 466 84 3978; Fax: +81 466 84 3978; email: XLT05104@nifty.com

Received 15 June 2012; Accepted 28 September 2012

---

### ABSTRACT

The  $\kappa$ -carrageenan mass fraction ( $F_C$ ) was a key factor to determine membrane character not only on mechanical strength but also on selected molecular permeability. It was defined as the following equation:  $F_C \equiv (\kappa C[g]/(P[g] + \kappa C[g]))$  and changed in desired range (0.33–0.83). This study reports the results of mass transfer and ultra-filtration experiments on model dye solutions, indicating Methyl Orange, Indigo Carmine, Bordeaux S, Brilliant Blue, and Rose Bengal, and the reference molecular weight are from 327 to 1017 Da. The fundamental parameters influencing the transport of dye such as experimental temperature, viscosity of the feed solution, initial dye concentrations have been determined. The effective diffusion coefficient of dye molecules in the biopolymer membrane was calculated. Outstanding molecular size recognition was appeared. The molecular weight cut-off values in  $F_C$ 0.33 membrane were 327 Da, and for  $F_C$ 0.66 membrane performed the results of 466 Da, respectively. The membrane changed from the wholly compact structure to the porous structure by an increase of the  $F_C$ , and then, we proved the changes of membrane formation while  $F_C$  value increased scientifically based on a scanning electron microscope (SEM) observation.

*Keywords:*  $\kappa$ -Carrageenan; Pullulan; Composite membrane; Mass transfer; Diffusion coefficient; Water permeability

---

### 1. Introduction

Treatment of wastewater containing dyes is one of the most important ecological problems because the effluents containing the dyes are not only highly colored, but also toxic to aquatic life [1]. Concerning membrane operations, ultrafiltration (UF), nanofiltration (NF), and reverse osmosis (RO) are the most applied. However, UF presents low rejection values,

whereas NF and RO are limited by the high osmotic pressures, which arise at high concentrations. The literature has provided different studies in which traditional methods are coupled with membrane processes [2–4]. Over the past two decades, membranes made from polymeric materials have become increasingly popular in industrial processes where reliable and repeatable purification or concentration is required. Membrane processes have wide industrial applications covering many existing and emerging use

\*Corresponding author.

in the chemical, environmental, water treatment, pharmaceutical, and food industries. Among all types of membrane process, NF as one of the most promising membrane technologies has the advantages of low operation pressure, higher permeate, and high rejection for small molecules separation from water solution. NF is shown to be the most effective principal for the separation of dyes from wastewater with relatively low investment [5,6]. The rejection of the aromatic poly (m-phenylene isophthalamide) (PMIA) NF membrane for dyes Eriochrome black T, Eriochrome blue black B, and Alizarine red were all over 98%, with a flux about 80 L/m<sup>2</sup>h, while the rejection for NaCl was only about 5.5% when tested at 0.4 MPa [7]. Two hydrophobic and one hydrophilic commercial membrane were selected to study the removal efficiencies of color and chemical oxygen demand (COD) from the real-dyehouse wastewater [8]. In another report on dye separation using polymeric hollow fiber membranes, excellent separation of Methylene blue (MB) from dye wastewater was obtained by micellar-enhanced UF using a combination of polysulfone hollow fiber UF membrane and sodium dodecyl sulfate surfactant the [9]. Further, the polysulfone-polyamide membranes exhibited molecular weight cut-off values in the range of 490–730 g/mole. They showed the rejections in the range of 60–97% for Reactive black-5 and Rhodamine-B for feed solutions containing 400–2,000 ppm dye with water flux of 10–35 mL/m<sup>2</sup>h at 170 kPa [10].

The biopolymers of marine algae origin are ubiquitous in surface waters and attracted to their potentialities. They present an enormous variety of structures, such as alginate, carrageenan, and chitosan. They are still under-exploited, and they should therefore be considered as an extraordinary source of biopolymer for membrane separation technology. In contrast, polysaccharides based on sugar unit repeating units, they are rich in –OH functional groups that form H bonds, in stereo-regular polysaccharides especially in bacterial polysaccharides such as pullulan, and a number of potential applications have been reported for pullulan as a result of its good film-forming properties. The great success as preparation of membrane used marine biopolymer is a tremendous extension of applications of marine polymers (casing, regenerate medical treatment, etc.) other than using in food industry. It is signaled that the development of membrane technology based on the sustainable and ecological polymer. Among the polysaccharides, starch and cellulose are the most frequently and massively modified, followed by carrageenans. Such marine algae as carrageenans should be pointed out that optimum growth conditions in

terms of sufficiently supplied sun light, stable temperature and no-effect on climate change on ground, and therefore, the stable harvest is expected. Biopolymer membranes are biodegradable, and therefore, they have the potential to cut carbon emission and reduce CO<sub>2</sub> quantities in the atmosphere. It is significant research for membrane separation technology to utilize biopolymer membrane. Sanchuan et al. investigated the impacts of cellulose acetate membrane properties on reactive dye removal from dye/salt mixtures through NF process. They found that the properties of the NF membrane play an important role in dye removal rate, stable permeate flux, and their change of behaviors with operational conditions [11].

As the adsorption-separation research, Aleksandra et al. combined the Langmuir and Freundlich adsorption isotherms to study the adsorption capability for the removal of textile dyes with the novel chitosan/montmorillonite membrane. They observed that the membrane exhibited high adsorption capacity at low concentration of dye. The Bezactiv orange adsorbed per unit mass of the adsorbent is high and is efficient than the other materials [12]. Papageorgiou et al. reported that the prepared Ca alginate/TiO<sub>2</sub> fibers exhibited high efficiency for the removal of Methyl orange from polluted water [13].

Carrageenan is a high-molecular-weight linear hydrophilic polysaccharide comprising repeating disaccharide units of galactose and 3,6-anhydrogalactose (3,6 AG), both sulfated and non-sulfated, joined by alternating  $\alpha$ -(1,3) and  $\beta$ -(1,4) glycosidic links. The main carrageenan types, kappa, iota, and lambda, can be prepared in pure form by selective extraction techniques from specific seaweeds and plants within those species. Kappa forms strong, rigid gels in the presence of potassium ions, iota forms soft gels in the presence of calcium ions, lambda does not gel and is used to thicken dairy products.

The  $\kappa$ -carrageenan comes from a family of linear water-soluble polysaccharides extracted from different species of marine red algae with a primary structure based on an alternating disaccharide repeating unit of  $\alpha$ -(1-3)-D-galactose-4-sulphate and  $\beta$ -(1-4) 3,6-anhydro-D-galactose. It is largely used as thickening, gelling agent or texture enhancer or stabilizer in food, pharmaceutical [14] and cosmetic [15] industries. Indeed, in aqueous solutions and in the presence of several cations,  $\kappa$ -carrageenan forms, on cooling, thermo-reversible gels. It is known that, in the presence of K<sup>+</sup>, thermo-reversible gelation of  $\kappa$ -carrageenan involves a coil-to-double helix conformational change, followed by aggregation of the ordered molecules in an infinite network [16] (Fig. 1).

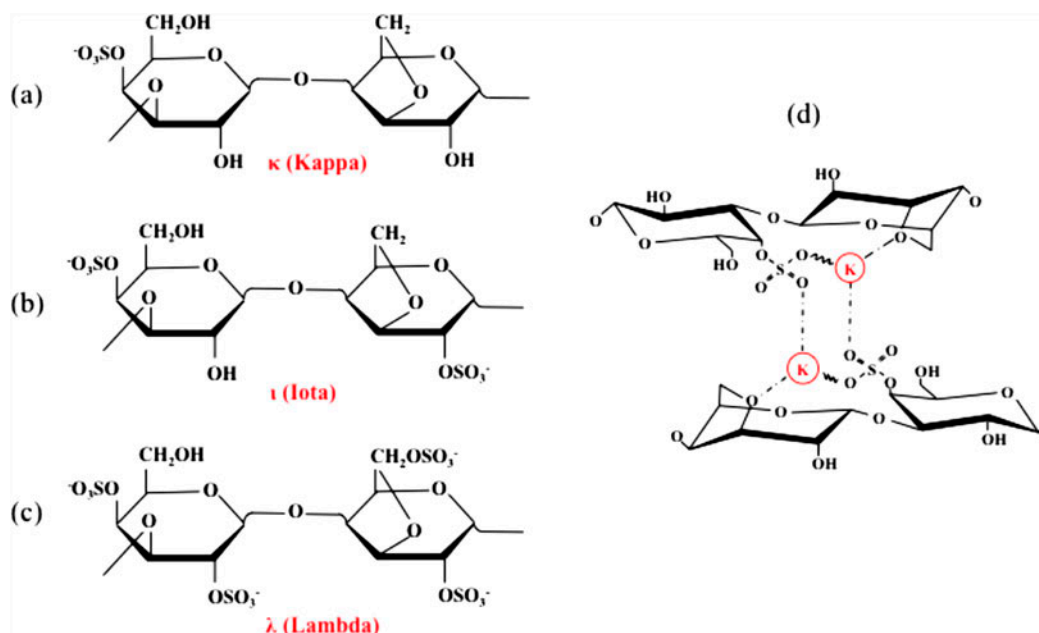


Fig. 1. The schematic chemical structures of (a)  $\kappa$ -carrageenan; (b)  $\iota$ -carrageenan; (c)  $\lambda$ -carrageenan; (d) crosslinked  $\kappa$ -carrageenan.

Pullulan is an extracellular glucan elaborated by a fungus of the genus *Aureobasidium*, commonly called 'black yeast', and was first discovered by Bauer (1938). Pullulan is a linear glucan consisting of repeating units of maltotriose joined by  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) linkages (see Fig. 2). The polymer also contains some maltotetraose units. A number of potential applications have been reported for pullulan as a result of its good film-forming properties [17].

Pure pullulan film, however, performs weak mechanical strength property, which is difficult to use in membrane separation process. In our study, combinations of  $\kappa$ -carrageenan and pullulan give

membrane strengths and elasticity. Pure pullulan single component membrane (cross-linked by glutaraldehyde) was too weak to make a flat membrane in our study (Fig. 3).

## 2. Materials

Pullulan was provided by Hayashibara Biochemical Laboratory (Okayama, Japan).  $\kappa$ -carrageenan, glutaraldehyde and potassium chloride were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Glucose (MW 180 Da), Methyl Orange (MW 327.34 Da) Bordeaux S (MW604.48 Da) and Rose Bengal (MW

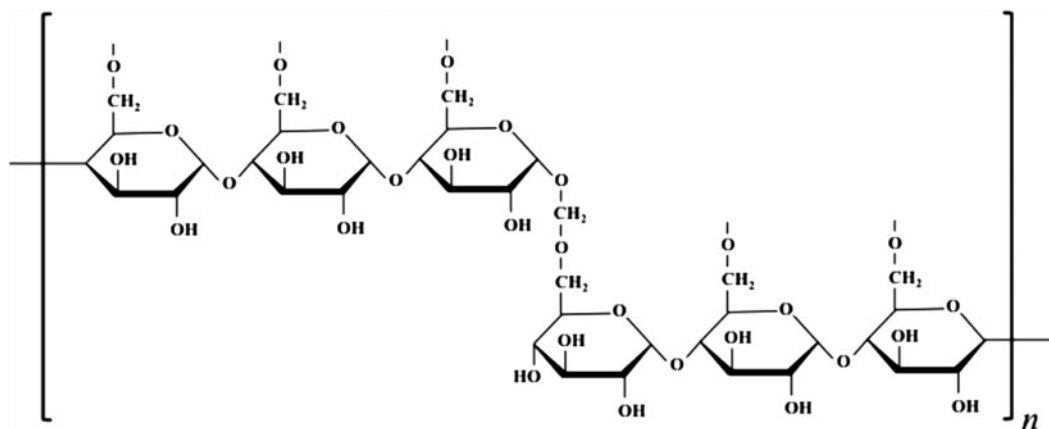


Fig. 2. The schematic chemical structure of pullulan.

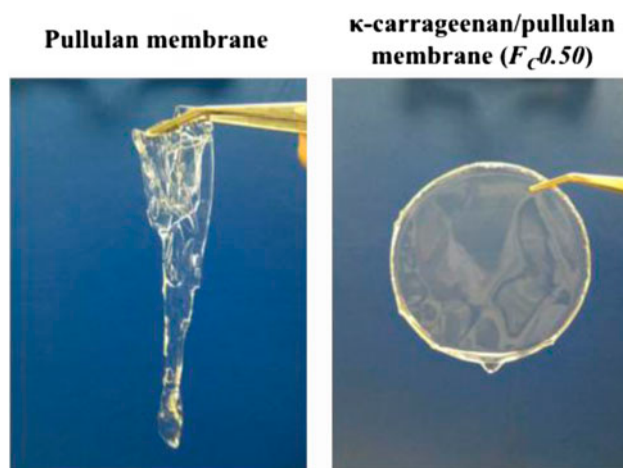


Fig. 3. The pictures of pure pullulan membrane and  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane.

1017Da) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Brilliant Blue (MW 826.0Da) was purchased from Sigma Chemical Co. (Perth, WA). Indigo Carmine (MW 466.37Da) was purchased from Kokusan Chemical Works, Ltd. (Tokyo, Japan).

Model dye solutions were prepared by dissolving dyes in pure water at room temperature (approximately 25°C). Dye concentration in the aqueous solutions was determined by measuring UV absorbance (UVMINI-1240 Shimadzu) at the wavelengths given in Table 1.

### 3. Experimental

#### 3.1. The preparation of composite membrane

$\kappa$ -carrageenan and pullulan powders were dissolved in distilled water (70°C) using a magnetic stirrer to prepare film-forming solutions of various blend-weight ratios. All polymer solutions were prepared based on 3g total polymer weight dissolved in 97g of distilled water at 70°C for one hour. In addition, each was stirred for one hour at 70°C with

concentration preparation of glutaraldehyde [18] (30–130mM) was added. The polymer solutions were then cast 20g onto for each Petri dish, followed by drying in an electrical blast-drying chest at 65°C for 24h. Potassium chloride solution was introduced into the dried membranes (attached to the Petri dishes) [19] (0.1–1.0M) for 24h. The swollen membrane was spontaneously peeled from the Petri dish at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and washed by pure water cleanly for further testing. Membrane samples were tested in triplicate.

#### 3.2. Photograph by Scanning Electron Microscopy (SEM)

The membranes were snapped under liquid nitrogen then dried in a vacuum freeze dryer (RLE-103, Kyowa Vacuum Engineering. Co. Ltd., Tokyo, Japan) (298K) for 24h. The membranes were then sputter coated with a thin film of Pt, using a sputter-coater (E-1010 Ion Sputter, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan). Images of cross sections of the membranes were obtained using a SEM (Miniscope TM-1000, Hitachi, Ltd.) (Fig. 4).

#### 3.3. Measurement of the composite membrane's mechanical strength

A rheometer (CR-DX500, Sun Scientific Co. Ltd., Tokyo, Japan) was used to determine the tensile strength and the percentage elongation at break. Three rectangular-strip specimens (10 mm wide, 40 mm long) were cut from each membrane for tensile testing. The initial grip separation was set to 20 mm, and the crosshead speed was set to 1 mm/s. The initial membrane thickness was measured using a micrometer (Mitutoyo, Kanagawa, Japan). The average thickness of the membrane strip was used to estimate the initial cross-sectional area of the membrane sample.

#### 3.4. Water content ( $H_V$ )

The water content was measured as follows. Membranes were immersed in distilled water at 25°C for 1 day. The membranes were removed from the

Table 1  
The dye components

Marker components	Molecular weight (MW) [Da]	Molecular size (MS)[Å]	Power terms (Referred from Fig. 9)	pH <sup>a</sup>	Structural formula
Methyl Orange (MO)	327	10.6	0.96	5.6	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>9</sub> O <sub>9</sub> SNa
Indigo Carmine (IC)	466	11.9	1.9	5.4	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>
Bordueax S (BS)	604	13.0	4.0	5.9	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub>
Brilliant Blue (BB)	826	14.4	3.4	5.5	C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>
Rose Bengal (RB)	1,017	15.8	3.6	5.8	C <sub>20</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> I <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>5</sub>

<sup>a</sup>Measured from the dye aqueous solutions at 1 mM.

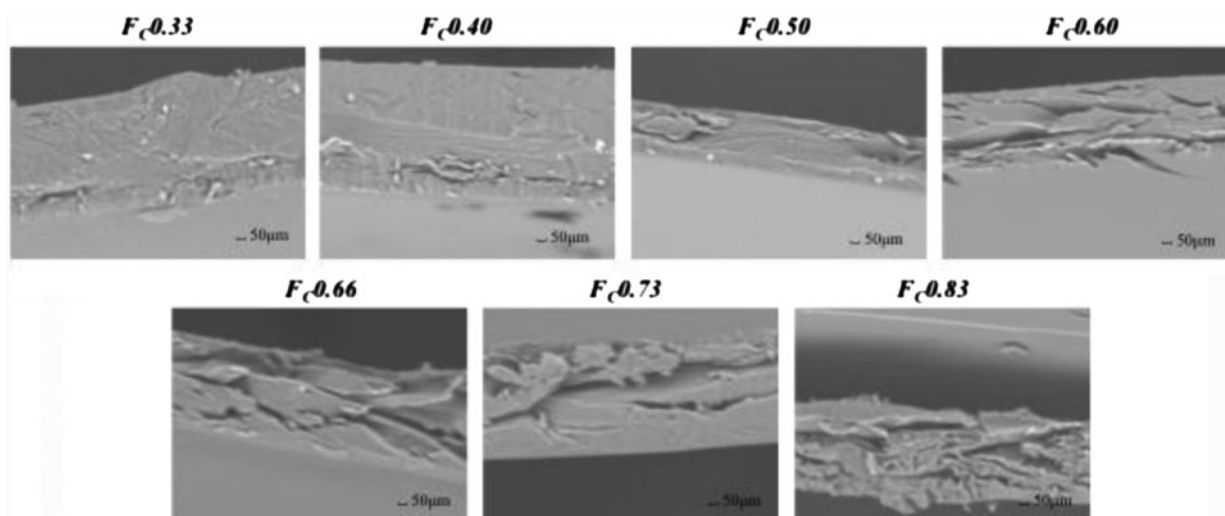


Fig. 4. SEM images of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane (cross-section).

water, tapped with filter paper to remove excess water on the membrane surface and weighed  $W_w$  in the wet state. The water content,  $H_v$ , is calculated from weights in the wet state,  $W_w$ , and in the dry state,  $W_d$ , as:

$$H_v = \frac{(W_w - W_d)/\rho_w}{(W_w - W_d)/\rho_w + W_d/\rho_m} \quad (1)$$

Here,  $\rho_w$  and  $\rho_m$  are the densities of water and membrane, respectively.

### 3.5. Effective diffusion coefficient ( $D_{eff}$ ) of dye molecules in the composite membrane

Molecular diffusion experiments were used a mass transfer setup (Fig. 5). The  $\kappa$ -carrageenan pullulan composite membrane was sandwiched between the

two halves of the glass made diffusion cell. The diffusion area was  $24\text{ cm}^2$ . One of the diffusion cell was filled with  $190\text{ cm}^3$  of water-soluble solution (1 mM) in distilled water, while the other diffusion cells received  $190\text{ cm}^3$  of distilled water. The diffusion of solutes through the membrane was monitored by periodically removing  $1\text{ cm}^3$  samples from both diffusion cells and determining the tested solute in the stripping side samples as detailed below.

It is supposed that since the concentrations in the two diffusion cells were uniform, the mass transfer flux was so small that the diffusion process can be regarded as a quasi-steady state. Accordingly, we can use Eqs. (2) and (3) to calculate the effective diffusion coefficients.

$$\ln\left(1 - \frac{2C_s}{C_f}\right) = -2A/VK_{OL}t \quad (2)$$

$$K_{OL}^{-1} = k_{L1}^{-1} + k_m^{-1} + k_{L2}^{-1} \quad (3)$$

The mass-transfer resistances  $k_{L1}^{-1}$  and  $k_{L2}^{-1}$  in the overall mass transfer resistance  $K_{OL}^{-1}$  can be neglected because of the sufficiently turbulent conditions in the two diffusion cells during the experiment.  $K_{OL}^{-1}$  did not depend on the stirring rate, and therefore, it directly indicates the membrane mass-transfer coefficient ( $k_m = D_{eff} l^{-1}$ ). The effective diffusion coefficient in the membrane ( $D_{eff}$ ) was evaluated from  $k_m$ . The initial membrane thickness  $l$  in the swollen state was measured with a micrometer (Mitutoyo, Kanagawa, Japan).

The mass-transfer characteristics were evaluated from the effective diffusion coefficient estimated by

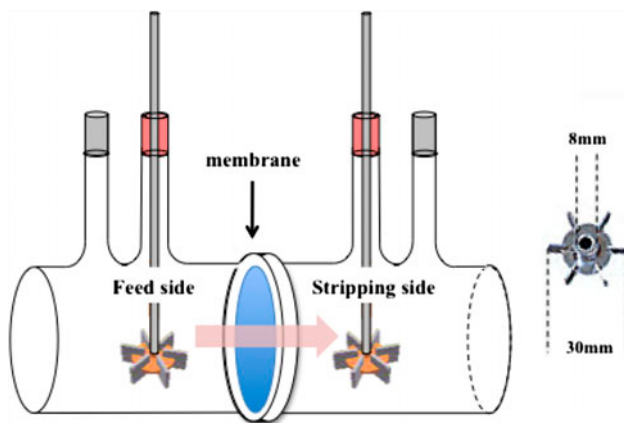


Fig. 5. The schematic image of the mass-transfer setup.

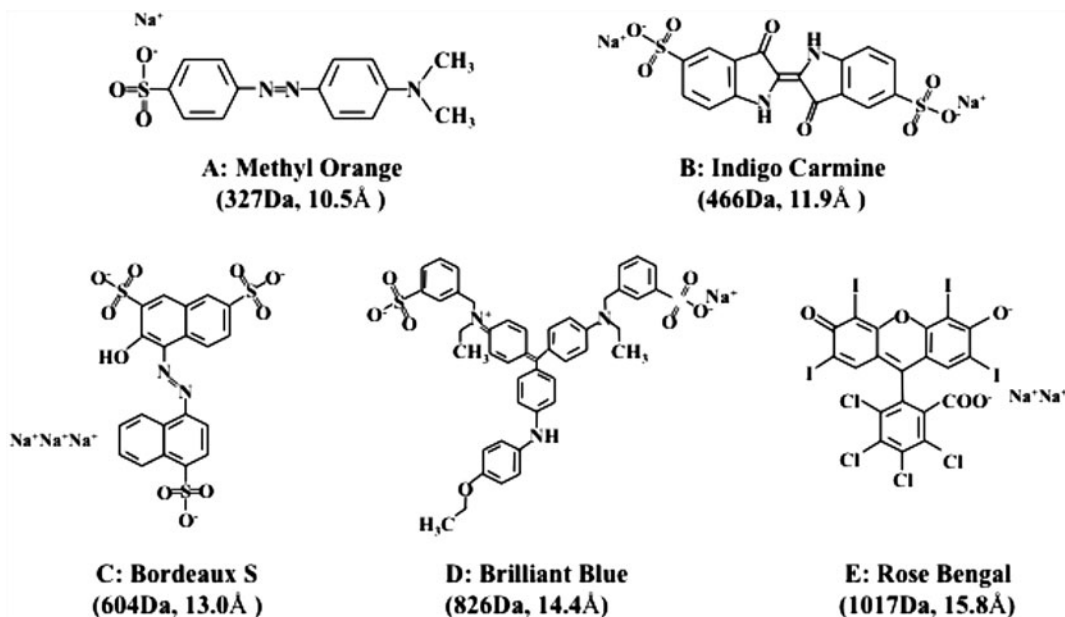


Fig. 6. The chemical structures of the dye molecules.

measuring the mass-transfer rate in the composite membrane. The dyes were employed to determine the size of the transfer channel in the membrane. The reference molecular size was from 327 to 1017 Da indicating Methyl Orange, Indigo Carmine, Bordeaux S, Brilliant Blue, and Rose Bengal. The chemical structures of the dyes molecule were shown in Fig. 6.

### 3.6. Measurement of the composite membrane separation performance

The dye solutions permeability experiment used a filtration cell (UHP-62K, ADVANTEC, Ltd., Japan) had a volume of 200 mL and the membrane surface area of 21 cm<sup>2</sup>. A magnetic stirring bar was installed in the membranes upper surface. The filtration cell was employed for both constant flux and constant pressure filtration. For operation in constant flux mode, a nitrogenous gas pump was connected to the inlet of the filtration cell and piped the permeate solution from the outlet. The weight of permeate solution was logged by electronic balance. The schematic representation of module and set-up are shown in Fig. 7. In our study, the permeate flux can be calculate by

$$J = \frac{W}{A\Delta t} \quad (4)$$

Here,  $W$  is the total mass of the water or solution permeated during the experiment;  $A$  is the membrane surface area; and  $\Delta t$  is the operation time. Rejection,  $R$ , is calculated using the following equation:

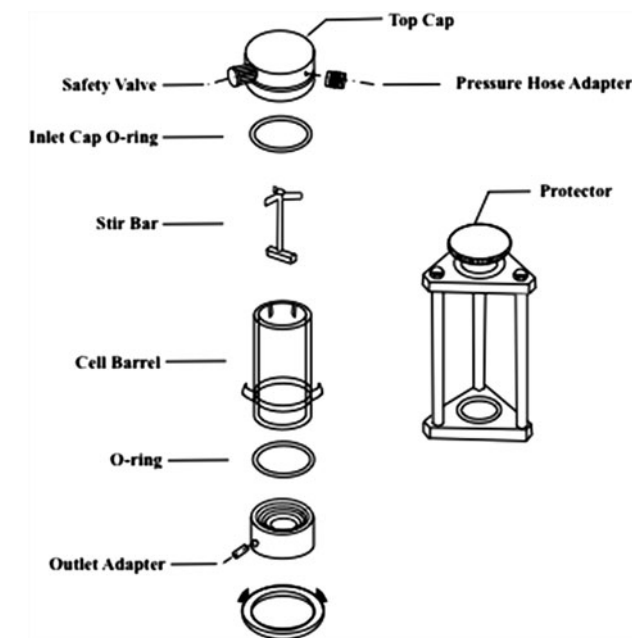


Fig. 7. The schematic representation of membrane permeation module.

$$R = 1 - \frac{C_P}{C_F} \quad (5)$$

where  $C_P$  is the concentration of permeate and  $C_F$  is the concentration of feed.

## 4. Results and discussion

### 4.1. Measurement of the composite membrane's mechanical strength

The lower  $F_C$  membrane ( $F_C 0.33$ ) is convenient to investigate the influence dehydration by glutaraldehyde, because the lower  $F_C$  membrane ( $F_C 0.33$ ) contains many hydroxyl groups bonding to pullulan. The polymeric framework of the  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane became more densely populated with increasing glutaraldehyde concentration, and its mechanical strength was elevated. The mechanical stress increased with increasing glutaraldehyde concentration and then leveled off over 70 mM [20]. Authors set the concentration of glutaraldehyde and potassium chloride-immersion condition at 90 mM and 0.7M, respectively. Fig. 8 represents the effect of  $F_C$  values on membrane mechanical strength. The maximum stress linearly increased with proportional to  $F_C$  values, and the maximum strain was appeared at 35%.

### 4.2. Measurement of the composite membrane separation performance

In Fig. 9, the logarithmic plots of diffusion coefficients ( $D_{eff}$ ) in membrane plotted against the fraction of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ) in composite membrane, showing that the  $D_{eff}$  changes vary directly with the  $F_C$  value. On molecular range of 327–1017 Da, a high-molecular-weight component indicates a higher  $D_{eff}$  changes in the same composite membrane; however, on the Bordeaux S (604 Da) the  $D_{eff}$  changes is showed higher than Brilliant Blue (826 Da) and Rose Bengal (1017 Da). Therefore, we could predict that the changes of  $F_C$  value from 0.33 to 0.75 could regulate

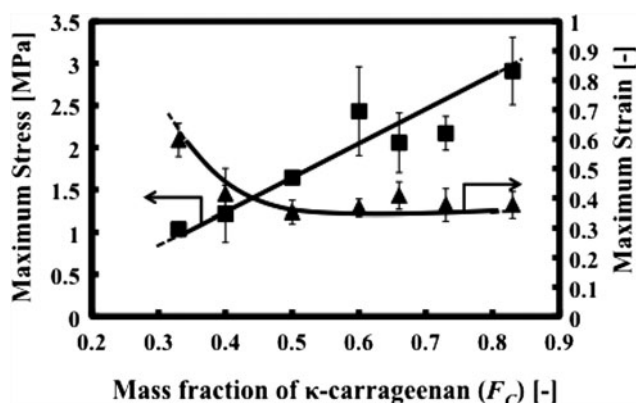


Fig. 8. Effect of  $F_C$  on the maximum stress and the strain of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane. The concentration of GA and KCl were set at 90 mM and 0.7 M, respectively.

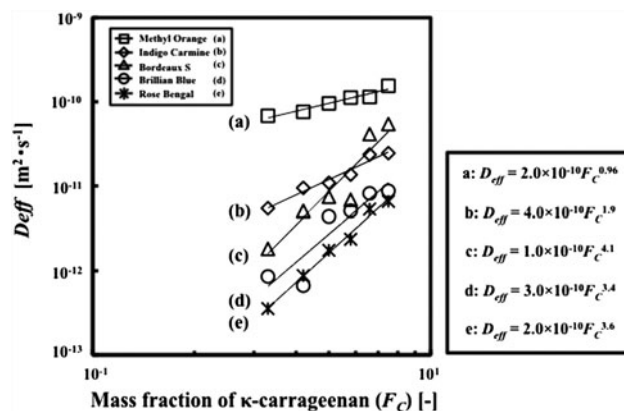


Fig. 9. Change of effective diffusion coefficient ( $D_{eff}$ ) with mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ). Empirical correlations were obtained, the power terms of  $F_C$  in empirical equations were summarized in Table 1.

the size of the mass transfer channel up to approximately 2 Å (Remainder of subtract molecular size of Methyl Orange (11 Å) from Bordeaux S (13 Å)).

Fig. 10(a) shows the logarithmic plot of the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ) against to the effective diffusion coefficient ( $D_{eff}$ ) of Indigo Carmine, which indicated that  $D_{eff}$  should be severely dependent when  $F_C$  values were changed ( $D_{eff} \propto F_C^{1.9}$ ). On the other hand, in Fig. 10(b), the water content ( $H_V$ ) of membrane had a weak potential for  $F_C$  values' changing ( $H_V \propto F_C^{0.15}$ ). There is a great difference (approximately 12 times) between exponential terms.

So in Fig. 11 shows the dependence property based on the radicals of relational expressions that as mentioned in Fig. 9 and molecular sizes of dyes. The value of the radical was appeared at 3.3 ( $D_{eff} \propto \text{volume of dye molecule}$ ), and therefore, authors came under review in the connection between water content (free volume) and mass transfer through membrane. The presumption that molecular transport is regulated by free volume was first introduced by Cohen and Turnbull (1959). The dye molecules diffuse into the membrane through the void of polymer chain (capillary model) or the free volume (free-volume model). The difference between the two models exists because of the assumption that void may exist in the membrane. The void of polymer chain plays the main role in transport and is neglected in dependence of the free-volume in the  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane. Thus the molecular size distribution is the physical properties influenced by the variation of the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ), and in short, the dye molecule was smartly choosing the size which suitable to itself, and diffusing through the membrane.

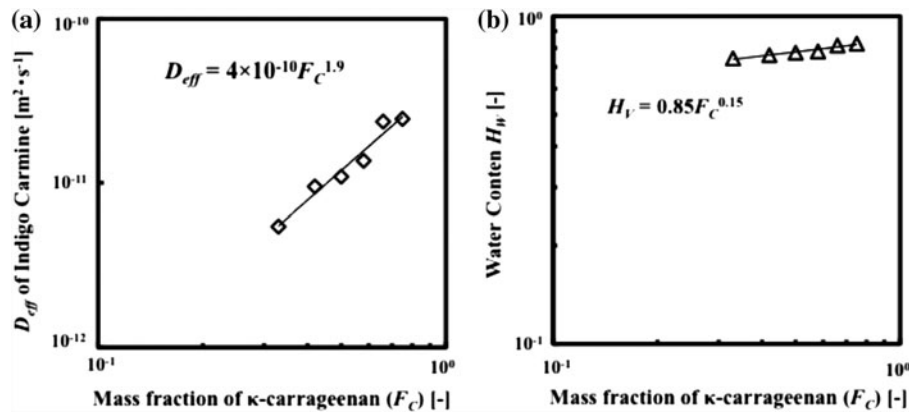


Fig. 10. The effect of mass transfer of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ) in (a)  $D_{eff}$  of Indigo Carmine; and (b) water content ( $H_V$ ).

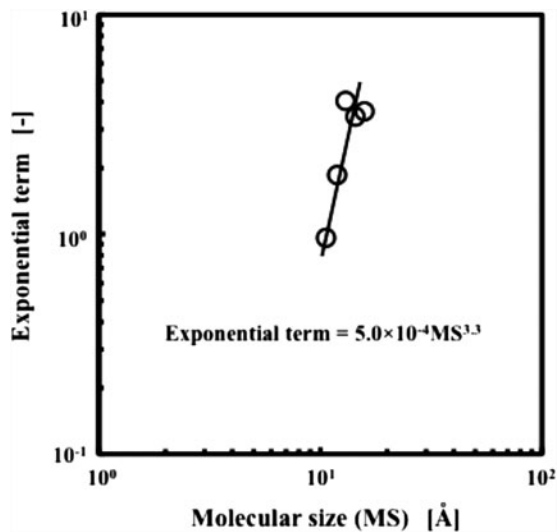


Fig. 11. The dependence property based on the radicals of relational expressions that as mentioned in Fig. 9 and molecular sizes of dyes.

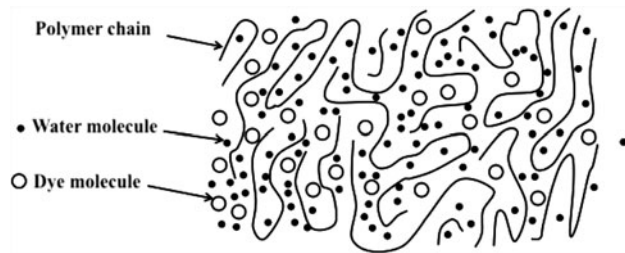


Fig. 12. The model of the dye molecule diffuse through the void of polymer chains.

Fig. 12 illustrates the model of the dye molecule diffuse through the void place of polymer chain. The information about the model is necessary, because the dye molecule can diffuse into the domain with a

large free-volume fraction, and this domain is only the path of molecular diffusion. The variable void place (pores) of the polymer chains is activated and is the real factor to determine the transports.

#### 4.3. Effect of temperature and viscosity of solutions on membrane permeability

Fig. 13 presents the permeate flux of pure water as a function of temperature. Along with an increase in temperature, the permeate flux increased linearly.  $F_C 0.33$  membrane, the permeate flux of  $0.13 \text{ g m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at  $31^\circ\text{C}$  was about 1.4 times higher than  $0.09 \text{ g m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at  $20^\circ\text{C}$ , whereas  $F_C 0.66$  membrane the permeate flux of  $0.22 \text{ g m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at  $31^\circ\text{C}$  was about 2.2 times higher than  $0.1 \text{ g m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at  $20^\circ\text{C}$ . These phenomena might be due to the effect of temperature on the viscosity of solution, the other reason might be that  $\kappa$ -carrageenan is sulfated only at C4 in the 1,3-linked galactose ring. The structure of  $\kappa$ -carrageenan allows the formation of double-helical segment that can form gel structure at

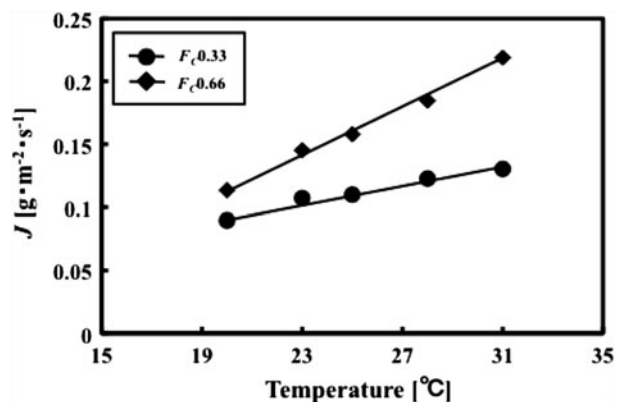


Fig. 13. Effect of feed temperature on permeate flux (pressure: 100 kPa).



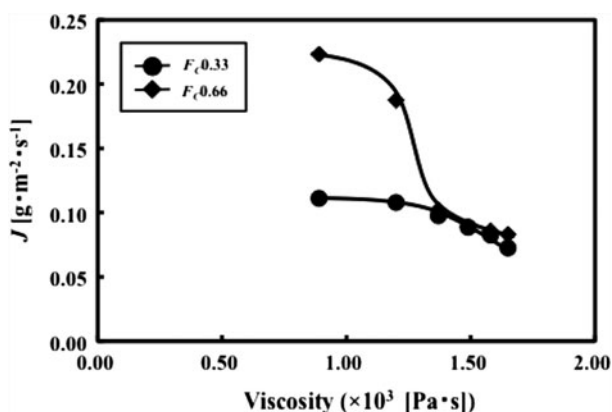


Fig. 14. Effect of feed viscosity on permeate flux (pressure: 100 kPa).

the appropriate conditions of potassium concentration and temperature. The temperature has a dramatic effect on  $\kappa$ -carrageenan gel-structure. The relative high temperature can make polymer chain of  $\kappa$ -carrageenan more spongy and larger pores.

Authors adjusted the viscosity of feed solution with different concentrations of glucose solutions. Variation in the viscosity of glucose was studied on the membrane permeation performance as shown in Fig. 14. The membrane fluxes of F<sub>C</sub>0.33 and F<sub>C</sub>0.66 membrane filtration experiments were both impair with the elevated solution viscosities. According to Fig. 14, compared with the F<sub>C</sub>0.33 and F<sub>C</sub>0.66 membrane in permeability at different solution viscosity of the feed solution F<sub>C</sub>0.66 membrane had good permeation properties at low-viscosity solution, but dramatically decreased in the high viscosity of the glucose solution, whereas F<sub>C</sub>0.33 membrane has only a little change in permeation flux.

#### 4.4. Membrane performance in dye separation

The experiments were aimed at evaluating the application of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane for the decolorization of dye solutions. The effects of the dye molecular weight and viscosity on the process were verified. The basic transport and separation properties of the membrane permeation were determined prior to the long-term experiment, which was shown in Fig. 15. It is likely that the worsening of membrane transport properties (in terms of membrane permeability to pure water) was caused by the high-molecular-weight dyes. Furthermore, it is also worth that the decreases in dye permeate flux is pronounced for the  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane, which the size of separated particles is anticipated to be much similar with the mean pore size.

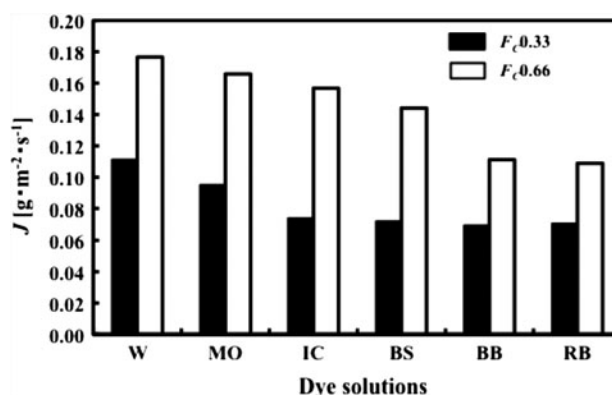


Fig. 15. Membrane flux permeation of various model dye solutions (pressure: 100 kPa). (Water; MO: Methyl Orange; IC: Indigo Carmine; BS: Bordeaux S; BB: Brilliant Blue; RB: Rose Bengal).

#### 4.5. Membrane performance in dye treatment

The selectivity of a membrane is usually represented by its molecular weight cut-off. This is defined as the minimum molar mass of a test solute that is 90% retained (or 95% depending on the manufacturer) by the membrane.

Fig. 16 shows that the plots of the rejection rate for tracer molecules according to their molar mass: the selectivity curve. The molecular weight cut-off values of F<sub>C</sub>0.33 membrane were 327 Da, and for F<sub>C</sub>0.66 membrane performed the results of 466 Da, respectively.

From Fig. 16, the rejections of Bordeaux S, Brilliant Blue and Rose Bengal were achieved 96–98%, which demonstrated that the  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane had low-molecular-weight cut-off and good performance in dye treatment.

Different dye solutions were treated at 25°C and 100 kPa with  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane, respectively. The decolorization effect of the membrane was shown in Fig. 17. It can be seen that

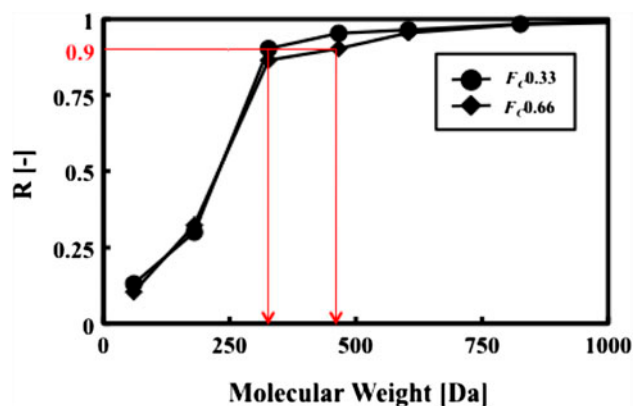


Fig. 16. The selective curve of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane for dye molecules.

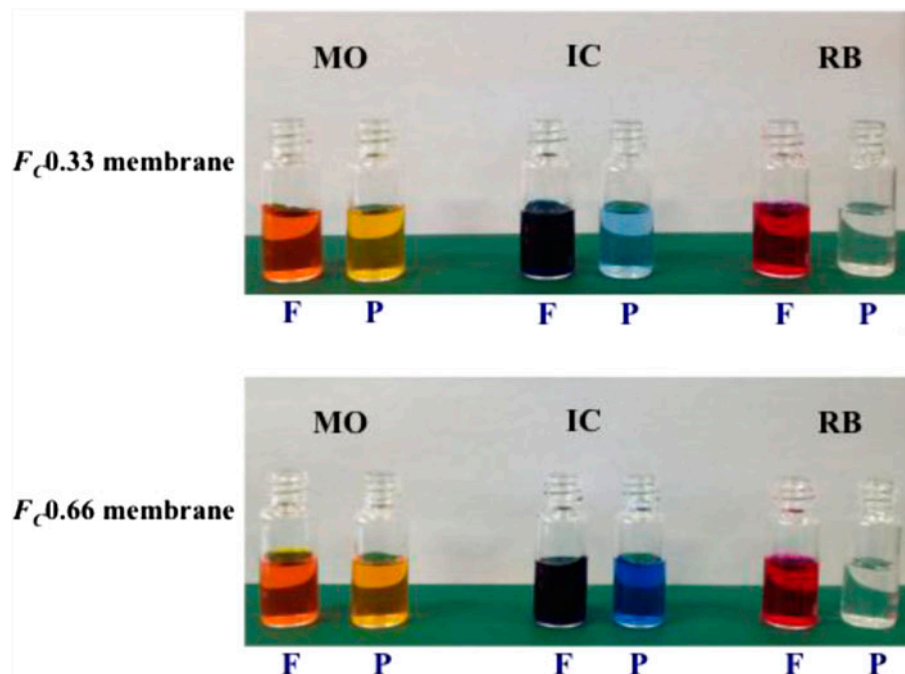


Fig. 17. Photograph of the membrane performance in decolorization (F and P represent feed solution and permeate solution, respectively. The dyes used Methyl Orange (MO), Indigo Carmine (IC), and Rose Bengal (RB)).

the permeated solutions of Rose Bengal (1017 Da) was completely colorless as pure water, the dyes were partially removed when the Methyl Orange (327 Da) and Indigo Carmine (466 Da) applied to larger molecule is expected high rejection.

## 5. Conclusions

Biopolymer  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane was successfully prepared by the casting method. It has the sufficient mechanical strength enough for a practical use and the excellent mass transfer character especially on molecular size screening (327–1017 Da). The relationship between mass transfer character and the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan in the composite membrane was formulated based on the experiments of mass-transfer flux and pure water flux. The results provided a novel and simple method of preparation membrane and the size of mass transfer channel based on molecular-size indicators and suggested that different  $F_C$  values significantly affect the mass-transfer permeability. The membrane can be applied in the removal of dyes from aqueous solutions. The membrane with low-molecular-weight cut-off (the molecular weight cut-off value of  $F_C0.33$  ( $F_C0.66$ ) membrane was 327 Da (466 Da)) had good rejection in dye solution and had relatively high-flux permeation, which were suitable to be applied in

desalination of dyes with low-molecular-weight. The dye treatment experiment indicated that the membrane showed good performance molecular weight higher than 1000 Da.

## Acknowledgement

This study work was supported by research funding grants provided by the Iijima Memorial Foundation for the Promotion of Food Science and Technology. The authors sincerely thank Dr. Kei Tao of Nihon University, who provided technical assistance on SEM photography.

## Nomenclature

$A$	—	area of membrane [ $\text{m}^2$ ]
$C_f$	—	initial concentration of feed solution [M]
$C_s$	—	concentration of stripping solution [M]
$D_{\text{eff}}$	—	effective diffusion coefficient [ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ]
$J$	—	water-permeated flux [ $\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]
$K_{\text{OL}}$	—	overall mass-transfer coefficient [ $\text{m s}^{-1}$ ]
$K_{\text{OL}}^{-1}$	—	overall mass transfer resistance [ $(\text{m s}^{-1})^{-1}$ ]
$k_m$	—	membrane mass-transfer coefficient [ $\text{m s}^{-1}$ ]
$k_{L1}$	—	membrane mass-transfer coefficient in feed phase [ $\text{m s}^{-1}$ ]
$k_{L2}$	—	membrane mass-transfer coefficient in stripping phase [ $\text{m s}^{-1}$ ]

- $l$  — membrane thickness [m]  
 $\Delta P$  — operational pressure [kPa]  
 $\Delta t$  — time [s]  
 $V$  — volume of aqueous solution in the transfer cell [m<sup>3</sup>]

## References

- [1] V.K. Gupta, Suhas, Application of low-cost adsorbents for dye removal—A review, *J. Environ. Manag.* 90 (2009) 2313–2342.
- [2] T. Kim, C. Park, S. Kim, Water recycling from desalination and purification process of reactive dye manufacturing industry by combined membrane filtration, *J. Clean. Prod.* 13 (2005) 779–786.
- [3] G. Capar, U. Yetis, L. Yilmaz, Membrane based strategies for the pre-treatment of acid dye bath wastewaters, *J. Hazard. Mater. B* 135 (2006) 423–430.
- [4] I.T. Norton, W.J. Frith, Microstructure design in mixed biopolymer composites, *Food Hydrocolloid.* 15 (2001) 543–553.
- [5] L. Yang, Z. Shuling, Z. Zheng, R. Jiannan, G. Zhi, L. Jiashuang, W. Guibin, Novel sulfonate thin-film composite nanofiltration membranes with improved water flux for treatment of dye solutions, *J. Membr. Sci.* 394–395 (2012) 218–229.
- [6] F. Elazhar, M. Tahaikt, A. Achatei, F. Elmidaoui, M. Taky, F.E. Hannouni, I. Laaziz, S. Jariri, M.E. Amrani, A. Elmidaoui, Economical evaluation of the fluoride removal by nanofiltration, *Desalination* 249 (2009) 154–157.
- [7] H. Jian, Z. Kaisong, The high flux poly (*m*-phenylene isophthalamide) nanofiltration membrane for dye purification and desalination, *Desalination* 282 (2011) 19–26.
- [8] M. Simonič, A. Lobnik, The efficiency of a hybrid flocculation/UF process for a real dye-house effluent using hydrophilic and hydrophobic membranes, *Desalination* 271 (2011) 219–224.
- [9] J.-H. Huang, C.-F. Zhou, G.-M. Zeng, X. Li, J. Niu, H.-J. Huang, L.-J. Shi, S.-B. He, Micellar-enhanced ultrafiltration of methylene blue from dye wastewater via a polysulfone hollow fiber membrane, *J. Membr. Sci.* 365 (2010) 138–144.
- [10] S.K. Maurya, K. Parashuram, P.S. Singh, P. Ray, A.V.R. Reddy, Preparation of polysulfone–polyamide thin film composite hollow fiber nanofiltration membranes and their performance in the treatment of aqueous dye solutions, *Desalination* 304 (2012) 11–19.
- [11] Y. Sanchuan, L. Meihong, M. Miao, Q. Ming, L. Zhenhua, G. Congjie, Impacts of membrane properties on reactive dye removal from dye/salt mixtures by asymmetric cellulose acetate and composite polyamide nanofiltration membranes, *J. Membr. Sci.* 350 (2010) 83–91.
- [12] R.N. Aleksandra, J.V. Sava, G.A. Dusan, Characterization of chitosan/montmorillonite membranes as adsorbents for Bezactiv Orange V-3R dye, *J. Hazard. Mater.* 209–210 (2012) 256–263.
- [13] S.K. Papageorgiou, F.K. Katsaros, E.P. Favvas, G.E. Romanos, C.P. Athanasekou, K.G. Beltsios, O.I. Tziaila, P. Falaras, Alginate fibers as photocatalyst immobilizing agents applied in hybrid photocatalytic/ultrafiltration water treatment processes, *Water Res.* 46 (2012) 1858–1872.
- [14] M. Thommesa, W. Blaschek, P. Kleinebudde, Effect of drying on extruded pellets based on  $\kappa$ -carrageenan, *Eur. J. Pharm. Sci.* 31 (2007) 112–118.
- [15] C. Valenta, K. Schultz, Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations, *J. Control. Release* 95 (2004) 257–265.
- [16] M.R. Mangionea, D. Giacomazza, D. Bulone, V. Martorana, G. Cavallaro, P.L. San Biagio, K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> effects on the gelation properties of  $\kappa$ -carrageenan, *Biophys. Chem.* 113 (2005) 129–135.
- [17] R.S. Singh, G.K. Saini, J.F. Kennedy, Pullulan: Microbial sources, production and applications, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 515–531.
- [18] L. Lebrun, J.F. Blanco, M. Metayer, Preparation of ion-exchange membranes using pullulan as polymer matrix, *Carbohydr. Polym.* 61 (2005) 1–4.
- [19] S. Datta, K. Mody, G. Gopalsamy, B. Jha, Novel application of  $\kappa$ -carrageenan: As a gelling agent in microbiological media to study biodiversity of extreme alkaliphiles, *Carbohydr. Polym.* 85 (2011) 465–468.
- [20] W. Peng, M. Imai, Food polymer pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane performed smart function both on mass transfer and molecular size recognition, *Desalin. Water Treat.* 34 (2011) 239–245.

# ADVANCING DESALINATION

---

Edited by Robert Y. Ning

---



**INTECH**

---

# **Novel Biopolymer Composite Membrane Involved with Selective Mass Transfer and Excellent Water Permeability**

---

Peng Wu and Masanao Imai

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/50697>

---

## **1. Introduction**

Applications of bio-polymeric materials have increased significantly for both textile engineering and medical sciences. Use of biopolymer in place of artificial polymers has been increasing due to stringent environmental regulations [1]. The development of new-generation materials that extend the industrial and biomedical applications of membrane processes will require a high level of control of the characteristics of the base polymeric support layer [2]. Current research in membrane science is now focusing more on biopolymers from natural raw material with well-defined structure to develop new membrane materials [3]. Noticeably, biopolymer production can be sustainable, carbon neutral, and renewable because biopolymers are made from sea or land plant materials that can be grown year after year indefinitely. Novel biopolymer membranes enable separation based on other driving forces like electrical charge and physicochemical interactions, and with appropriate functional groups can provide applications such as tunable water permeation and separation, toxic metal capture, toxic organic dechlorination, and biocatalysts [4-5].

Biopolymers for stabilizers, thickeners, and gelling agents were extracted from various raw natural resources. They determine a number of critical functions including moisture binding, control, structure, and flow behavior that enable organisms to thrive in a natural environment [6]. A number of the typical biopolymers from natural resources such as alginate, cellulose, and chitin/chitosan have been applied for functional polymer networks (e.g., carriers for controlled drug release, membranes with regulated permeability, sensor devices, and artificial muscles). For these purposes, proper responses to changes in external physicochem-

ical conditions and developed internal microstructure of the gels are required. Interest in the behavior of biopolymer gels and networks has grown significantly. The various hydrophilic bio and/or artificial polymers that can be used for membrane formation are also discussed.

Various novel membrane materials and systems have been developed and applied. The technological benefits of such membrane materials and systems have begun to be identified for a wide range of applications for controlled drug delivery, chemical separation, water treatment, bio-separation, chemical sensors, tissue engineering, etc. There have been two main subjects of research in the field of biopolymer membrane materials and systems: development of novel and efficient biopolymer materials and improvement of capability of membrane processes and operations [7].

This chapter discusses the novel function of polysaccharides ( $\kappa$ -carrageenan ( $\kappa$ C) and pullulan (P)) in membrane formation and molecular-size screening. The  $\kappa$ -carrageenan mass fraction ( $F_C$ ) was a key factor in determining membrane characteristics for both selected molecular permeability and mechanical strength.

## 2. Development of Biopolymer membranes

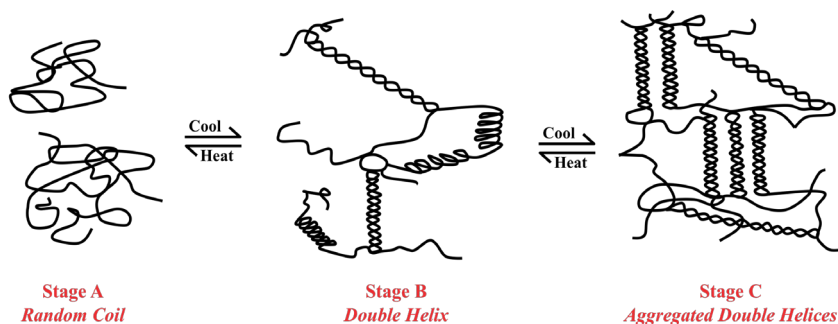
When discussing biopolymer gelation, the biopolymer types of interest fall naturally into two categories: protein and polysaccharides. A second classification is in terms of the molecular networks underlying the gels, that is, in terms of associative and particulate networks [8]. The present status of biological and ecological research demands much more emphasis on efficient biopolymers with multiple applications such as membrane-separation engineering.

One of the most common membrane types currently in use is the asymmetric cellulose acetate (CA) membrane. This high-flux, high-rejection membrane was developed in the early 1960s by Loeb and Sourirajan [9]. Chitin, poly ( $\beta$ -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine), is a natural polysaccharide of major importance, first identified in 1884. When the degree of deacetylation of chitin reaches about 50% (depending on the origin of polymer), it becomes soluble in aqueous acidic media and is called chitosan [10-11]. Chitosan membranes have been explored in many uses, such as in water-ethanol pervaporation [12-14], enzyme immobilization and cationic specimen transportation [15-16], protein separation [17] and concentration, controlled ingredient-release, and environmental applications [18-19]. Among the various biopolymers, alginate is the most studied matrix for membrane separation technology [20]. Hirst and Rees (1965) were the first to postulate that alginate is a polymer of mannuronic acid and guluronic acid having 1,4 linkage. Kashima and Imai (2011) investigated the  $\alpha$ -L-guluronic acid chain with regard to regulation of the mass-transfer characteristics of the alginate membrane [21]. Many other biopolymers also consist of membrane structures. Exploiting and improving the chemical and mechanical properties of biopolymer membranes will create many more applications in the membrane industry.

### 3. Novel biopolymer membrane materials ( $\kappa$ -carrageenan & pullulan)

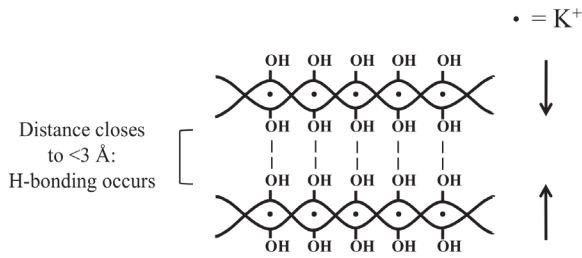
Biopolymers of marine algae origin are ubiquitous in surface waters and have attractive potential. The seaweed extractives of commercial importance fall into three main groups, two of which (agar and carrageenans) are derived from red algae, and the third (alginates) from brown algae. All three types of extractive are associated with the cell walls of the algae and resemble cellulose in basic molecular organization. Red algae are considered as the most important resource of many biologically active metabolites compared to other algal classes [22-23]. Marine algae as carrageenans have optimum growth conditions with sufficient sun light, stable temperature, and no climate change impact on the ground; stable harvests are thus expected. Marine algae can be produced in virtually unlimited amounts around seafaring nations. It contributes noticeably on the preventing Global Warming and coexistent with fishery.

Carrageenans are large, highly flexible molecules that curl and form helical structures. They are widely used in food and other industries as thickening and stabilizing agents. Carrageenans consist of alternating copolymers of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactose and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anhydro-D- or L-galactose. Several isomers of carrageenan are known ( $\kappa$ -,  $\iota$ -, and  $\lambda$ -carrageenans), and they differ in the number and position of the ester sulfate groups on the repeating galactose units.  $\kappa$ -Carrageenan has only one negative charge per disaccharide and tends to form a strong and rigid gel. The gelling power of  $\kappa$ -carrageenans imparts excellent film-forming properties, and  $\kappa$ -carrageenan forms a firm gel with the aid of potassium ions. Hot solutions of  $\kappa$ -carrageenans set when cooled below the gel point, which is between 30° and 70°, depending on the cations and other ingredients present, to form a range of gel textures. The two-step gel mechanism is illustrated in Fig. 1, with stage B being elastic (iota) and stage C being brittle (kappa).



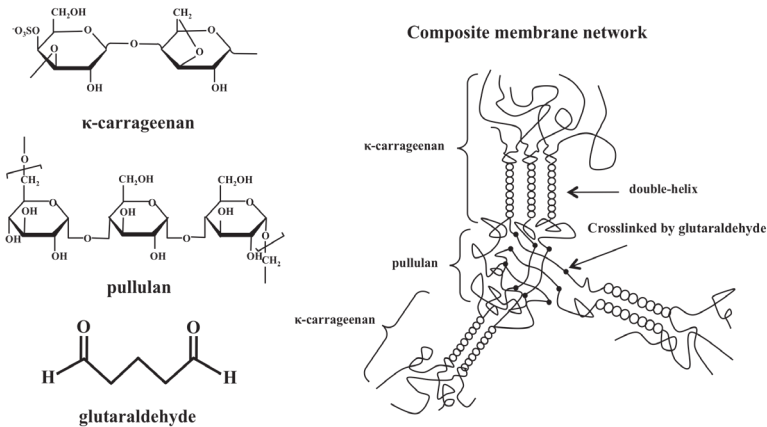
**Figure 1.** Models of conformational transition of  $\kappa$ -carrageenan and  $\iota$ -carrageenan.

$\kappa$ -Carrageenan selects potassium ions to stabilize the junction zones within the characteristically firm, brittle gel. Potassium ions counter sulphate charges without sterically hindering close approach and double-helix formation (Fig. 2) [24-30].



**Figure 2.** The gelation mechanism of  $\kappa$ -Carrageenan crosslinked by K<sup>+</sup> ions.

Pullulan is an extracellular glucan elaborated by a fungus of the genus *Aureobasidium*, commonly called black yeast. The structure of pullulan is a linear glucan consisting of repeating units of maltotriose joined by  $\alpha$ -D-(1-6) linkages. The safety of pullulan in foods is supported by its chemical composition, the purity of the final product, a series of toxicological studies, and the fact that it has been used about 30 years as an ingredient in human foods in Japan [31-33]. Recently, the demand for pullulan has rapidly increased for films and hard capsules, and its use in these fields is expected to grow [34-35]. The major interest in pullulan concerns its capacity to form strong, resilient films and fibers [36]. Pullulan can be used on its own or combined with other thickeners or gelling agents. The stringiness of pullulan may be a disadvantage for some applications, but this can be modified by adding a small amount of another polysaccharide such as carrageenan or xanthan gum [37]. Combinations of  $\kappa$ -carrageenan and pullulan achieve gel-network strengths and elasticity between the two extremes and consistent with the ratio used (Fig. 3).



**Figure 3.** Schematic representation of composite  $\kappa$ -carrageenan-pullulan chains.



In our study, original biopolymer composite membrane was successfully prepared from marine biopolymer ( $\kappa$ -carrageenan) and food polysaccharide (pullulan). Selective mass transfer and excellent water permeability were achieved. The membrane was characterized from the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan. The attractive potential of marine biopolymer ( $\kappa$ -carrageenan) combined with polysaccharide (pullulan) was demonstrated in membrane-separation engineering. The authors focused on the complex cross-linked biopolymers ( $\kappa$ -carrageenan and pullulan) regulating mass-transfer flux. The membrane was prepared by a simple casting method. The  $\kappa$ -carrageenan-pullulan composite membrane has sufficient mechanical strength for practical use and excellent mass-transfer characteristics, especially for molecular-size screening.

#### 4. Polymer membranes preparation

The most important part in any membrane separation process is choosing the membrane material. Membranes have very different structures, functions, transport properties, transport mechanisms, and materials. The methods of making membranes are just as diverse as the membranes are. The methods of making membranes are considering the large diversity suited for technical application. The following characteristic of membranes determine separation capability.

- Membrane materials.

Organic polymers, inorganic materials (oxides, ceramics, and metals), or composite materials.

- Membrane cross-section.

Isotropic (symmetric), integrally anisotropic (asymmetric), bi- or multilayer, thin-layer or mixed matrix composites.

- Preparation methods.

Phase separation (phase inversion) of polymers, sol-gel process, interface reaction, stretching, extrusion, track-etching, and micro-fabrication.

- Membrane shape.

Sheet, hollow fiber, capsule.

The process for forming a biopolymer membrane comprises three steps.:

I. Mixing a biomaterial in a solvent to define a gel.

II. Drying the gel to define a sponge having a solvent content.

III. Adjusting the solvent content of the sponge so that the sponge is substantially filled with the solvent.

#### 4.1. Preparing of $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membranes

$\kappa$ -Carrageenan and pullulan powders were dissolved in distilled water (70°C) using a magnetic stirrer to prepare film-forming solutions of various blend-weight ratios. All polymer solutions were prepared based on 3g total polymer weight dissolved in 97g of distilled water at 70°C for one hour. In addition, each solution was stirred for one hour at 70°C. Glutaraldehyde solution (30 ~ 130mM) was introduced into the polymer solutions [39]. And then twenty grams of the polymer solutions was then cast into a petri dish, followed by drying in an electrical blast-drying chest at 65°C for 24 hours. The dried membranes (attached to the petri dishes) were immersed in potassium chloride solution [40] (0.1 to 1.0M) for 24 hours. The swollen membrane spontaneously peeled from the petri dish at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and was washed clean with pure water for further testing. Membrane samples were tested in triplicate. Pure pullulan single component membrane (cross-linked by glutaraldehyde) was too weak to make a flat membrane in our study [41].

Mass fraction of $\kappa$ -carrageenan ( $F_c$ )	$F_c$ [-]	$\kappa$ -carrageenan [g]	Pullulan [g]
$F_c = \frac{\kappa - \text{carrageenan}[g]}{\kappa - \text{carrageenan}[g] + \text{pullulan}[g]}$	0.33	1.00	2.00
	0.42	1.25	1.75
	0.5	1.50	1.50
	0.58	1.75	1.25
	0.66	2.00	1.00
	0.75	2.25	0.75

**Table 1.** Mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_c$ ).

### 5. Measurement of biopolymer composite membranes' properties

Commercial membrane applications focus much effort on desalination requirements [42-43], membrane-fouling characterization [44-45], drinking-water disinfection [46-47], industrial waste treatment [48-49], food industry material separation [50-51], adsorption desalination [52-53], biofiltration [54], membrane bioreactor [55-56], thermal distillation [57], electro dialysis desalination [58], reverse-osmosis desalination [59], oil-water separation applications [60], and future membrane and desalination developments. The stress-strain correlation of biopolymer membrane is affected by the origin of polymers, molecular weight, and methods of membrane preparation, conditioning, and cross-linking. Biopolymer membranes may be amorphous homopolymers or heterogeneous, depending on whether they are prepared from a single polymer or from blended polymers [61]. However, the properties of biopolymer membranes are inconsistent with the requirements of industrial-processing technologies, since the range of biopolymers suitable for membrane-separation processes is limited. To expand the application area of commercial membranes, research on improving their properties is necessary.

### 5.1. Mechanical properties of $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane

A rheometer (CR-DX500, Sun Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used to determine the tensile strength and the percentage elongation at break. Three rectangular-strip specimens (10mm wide, 40mm long) were cut from each membrane for tensile testing. The initial grip separation was set to 20mm, and the crosshead speed was set to 1mm/s. The initial membrane thickness was measured using a micrometer (Mitutoyo, Kanagawa, Japan). The average thickness of the membrane strip was used to estimate the initial cross-sectional area of the membrane sample. Maximum Stress ( $\sigma$ ) (MPa) was calculated by dividing the maximum load (N) by the initial cross-sectional area (m<sup>2</sup>):

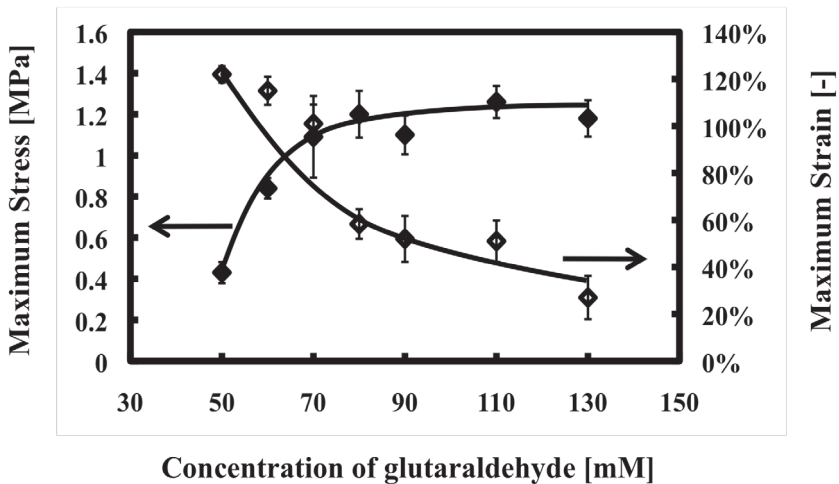
$$\sigma = \frac{T}{(b \times d)} \tag{1}$$

where  $T$  is the maximum load (N),  $b$  is the width of sample (m), and  $d$  is the membrane thickness (m).

Maximum Strain ( $\lambda$ ) (%) was calculated as follows:

$$\lambda = \frac{(L - L_0)}{(L_0)} \times 100\% \tag{2}$$

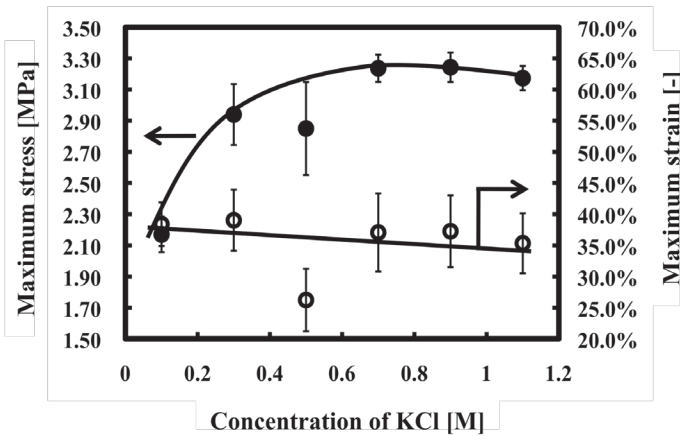
where  $L_0$  is the sample length before deformation and  $L$  is the sample length at break [62].



**Figure 4.** Effect of additive glutaraldehyde concentration on the maximum stress and strain of composite membrane.  $F_C$  was set at 0.33.

Dehydration of hydroxyl groups in the polysaccharide chain by glutaraldehyde facilitates formation of polymer networks. The polysaccharide composite membrane was further cross-linked with glutaraldehyde to reduce swelling and increase the structural strength of the membrane as well as to improve its thermal and mechanical stability [63]. The lower  $F_C$  membrane is convenient for investigating the influence of dehydration by glutaraldehyde because the lower  $F_C$  membrane contains many hydroxyl groups bonding to pullulan. The mechanical stress increased with increasing concentration of glutaraldehyde and became constant over 70mM. Figure 4 presents the polymeric framework of the membrane densely populated with increasing glutaraldehyde concentration.

$F_C$  0.75 membrane accounts for the largest mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan.  $\kappa$ -carrageenan is a key component for constructing the gel structure and for characterizing mechanical strength.



**Figure 5.** Effect of potassium chloride-immersion on the maximum stress and the strain of composite membrane.  $F_C$  was set at 0.75.

The authors prepared  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membranes with 90mM of glutaraldehyde added and 0.7M potassium chloride-immersion. (Fig. 5)

## 5.2. Water content

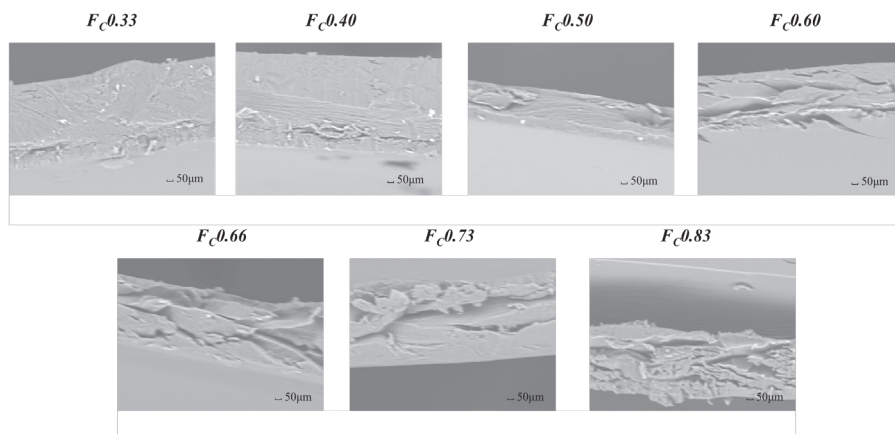
Water content is important for evaluating hydrophilic characteristics. The volumetric water content of the membrane indicated voids in the network that affect the water permeability [64]. Gravimetric methods were used to determine the mass-based water content ( $W_t$ ) [65]. The water content ( $W_t$ ) was measured as follows. Membranes were immersed in distilled water at  $25\pm 1^\circ\text{C}$  for 1 day to achieve natural hydration and swelling. The membranes were removed from the water bath, and excess water on the membrane surface was removed by filter paper. The mass of the swollen membrane  $W_w$  was then determined.

$$W_t = \frac{(W_w - W_d)}{W_w} \times 100\% \quad (3)$$

Here,  $W_d$  is the mass of the dried membrane.

### 5.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)

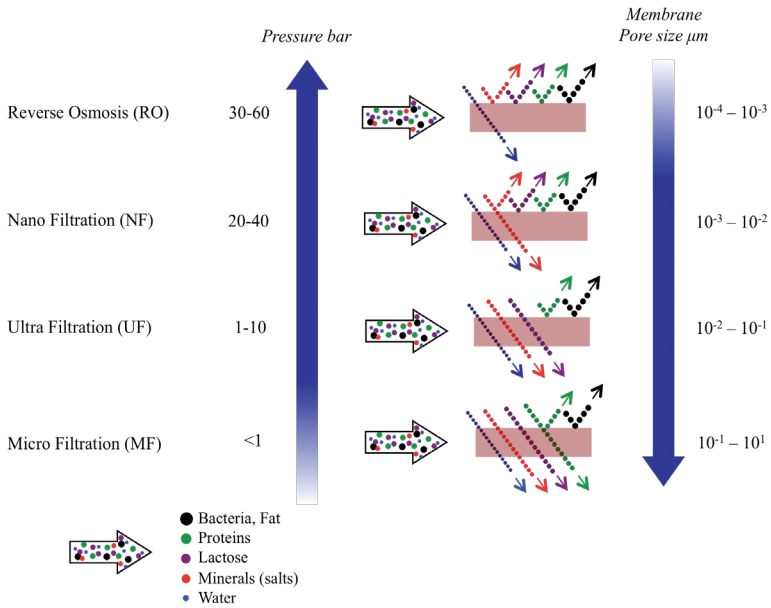
The membranes were snap-frozen in liquid nitrogen then dried in a vacuum freeze dryer (RLE-103, Kyowa Vacuum Engineering. Co., Ltd., Tokyo, Japan) (298 K) for 24 hours. The membranes were then sputter-coated with a thin film of Pt, using a sputter-coater (E-1010 Ion Sputter, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan). Images of cross sections of the membranes were obtained using a scanning electron microscope (Miniscope TM-1000, Hitachi, Ltd.,).



**Figure 6.** SEM images of k-carrageenan/pullulan composite membrane.

## 6. Mass transfer in biopolymer membrane

The prolific application of membrane separation processes in industry today is primarily due to innovations in membrane materials technology. Loeb and Sourirajan (1963) pioneered the first reverse-osmosis (RO) asymmetric cellulose acetate (CA) membrane capable of withstanding the rigors of industrial use [66]. Since then, many types of biopolymer membranes have been developed and commercialized: membranes for microfiltration (MF) [67-68], ultrafiltration (UF) [69-70], nanofiltration (NF) [71-72], gas separation [73-74], and so on. These membrane separation systems are illustrated in Fig. 7.



**Figure 7.** Principles of membrane filtration.

The energy consumption for these technological filtration (MF, UF, and NF) processes is low, as latent heat in the phase change is not consumed in the membrane separation process. Membrane separation is expected to be one of the most promising and energy-efficient separation technologies. Diffusion of solutes through non-porous biopolymer membranes is discussed using a molecular-diffusion model [75-76].

In many conventional porous membranes, the membrane material is not an active participant; only its pore structure matters, not its chemical structure [77]. A common feature of biopolymer membranes in the solution-diffusion process is that the solute molecules dissolved in the biopolymer membranes diffuse through the polymer chains (also called mass-transfer channels) and then exit the membrane at the other side phase [78]. The biopolymer is an active participant in both the solution and diffusion processes.

### 6.1. Diffusion in biopolymer membrane

According to a solution-diffusion mechanism based on Fick's law (Eq. 4) [79], mass transfer flux was indicated as followed:

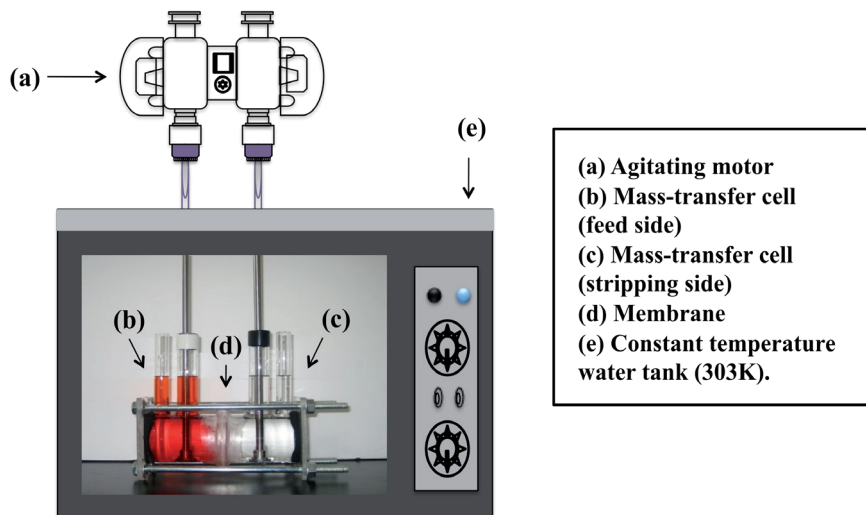
$$J_i = -D \frac{dc_i}{dx} \tag{4}$$

where

$J_i$  is the flux of component  $i$  ( $\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ),

$D$  is the diffusion coefficient ( $\text{m}^2/\text{s}$ ), and

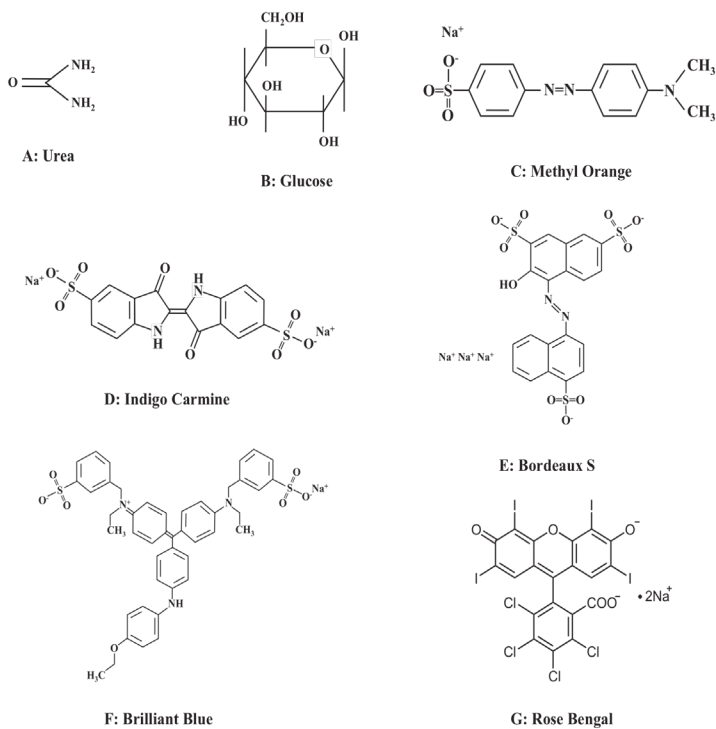
$dc/dx$  is the concentration gradient for component  $i$  over the length  $x$  ( $\text{mol}/(\text{m}^3\text{m})$ ).



**Figure 8.** Schematic diagram of the mass-transfer setup in our experiment.

In this chapter, mass-transfer experiments were carried out using a standard side-by-side diffusion cell with two compartments separated by a membrane with an area of  $23\text{cm}^2$  (Fig. 8).

The diffusion cell was installed in a water bath to keep the temperature constant (303K). The feed compartment was filled with water-soluble marker components in solution (190ml) (Fig. 9), and the stripping compartment was filled with distilled water. During the experiment, the two compartments of solutions were stirred at a constant speed ( $850\text{min}^{-1}$ ) in order to minimize the film mass-transfer resistance near the membrane surface. The solutions in the feed and stripping compartments were sampled at a fixed time interval, and the concentration was determined by measuring UV absorbance. The wavelengths of maximum absorbance are listed in Table 2. The relationship between concentration and absorbance was calibrated by taking spectra of known concentrations. The diffusion of solutes through the membrane was monitored by periodically removing  $1\text{cm}^3$  samples from both diffusion cells.



**Figure 9.** Chemical structure of the water-soluble components.

Marker components	Molecular Weight [Da]	Molecular Size [Å]	pH <sup>a</sup>	Structural Formula
Urea	60	6.0	5.4	NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
Glucose	180	8.9	5.8	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Methyl Orange	327	10.6	5.6	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>9</sub> O <sub>9</sub> SNa
Indigo Carmine	466	11.9	5.4	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>
Bordeaux S	604	13.0	5.9	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub>
Brilliant Blue	826	14.4	5.5	C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>
Rose Bengal	1017	15.6	5.8	C <sub>20</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> I <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>5</sub>

<sup>a</sup> Determined from the marker component aqueous solutions of concentration at 1 mM.

**Table 2.** The water-soluble components and their molecular size.

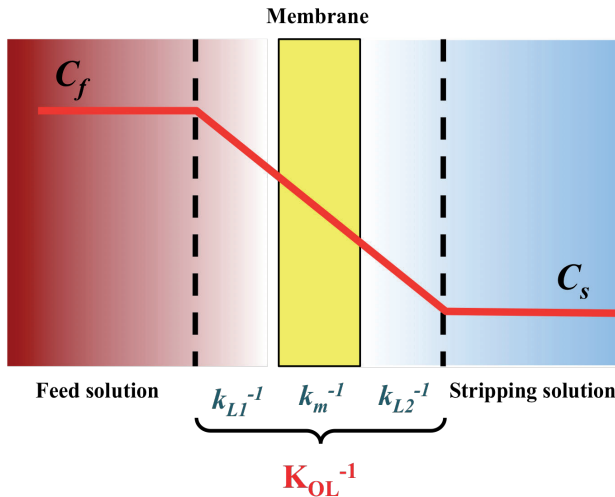


## 6.2. Determination of effective diffusion coefficient ( $D_{eff}$ ) in the biopolymer

The concentration of the solution transported through the membrane is required to estimate the mass-transfer characteristics of the membrane. Diffusion is a fundamental phenomenon in several physical and chemical molecular processes, representing the molecular motion of neutral or charged species in solutions [80]. The diffusion coefficient in liquid is an important parameter for understanding the complex processes of mass transfer. Several empirical methods for estimating the diffusion coefficient in aqueous phase consider infinite dilution and are based on molecular-size indicators. Figure 10 presents a schematic of the mass-transfer model. This chapter introduces the following method [81].

$$\text{Wilke \& Chang, } D_w = \frac{1.86 \times 10^{-18} (\phi_B M_w)^{0.5}}{\mu_w v_A^{0.6}} \quad (5)$$

Here,  $D_w$  is the diffusion coefficient of the solute in water [ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ],  $\mu_w$  is the viscosity of water [ $\text{Pa s}$ ], and  $\phi_B$  is the association factor for solvent B at the required temperature T [K] (for water,  $\phi_B=2.6$ ).  $M_w$  is the molar mass of water [ $\text{g mol}^{-1}$ ], and  $v_A$  is the molar volume of solute A at the normal boiling point [ $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ ].



**Figure 10.** The schematic mass transfer model.

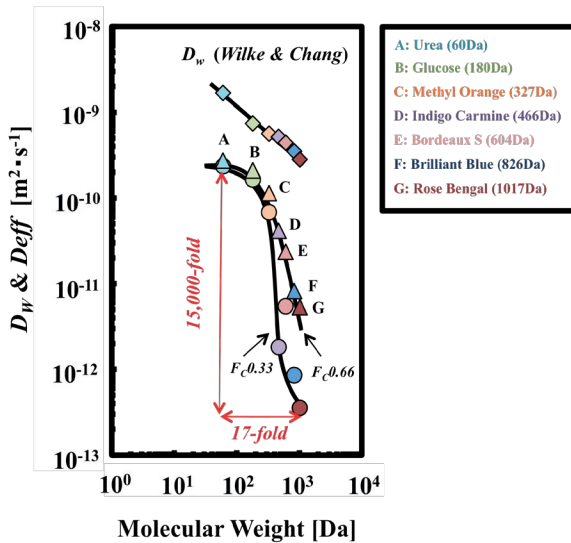
The concentrations in the two diffusion cells were uniform, so the mass-transfer flux was so small that the diffusion process can be regarded as in the quasi-steady state. Accordingly, we can use Eqs. (6) and (7) to calculate the effective diffusion coefficients.

$$\ln\left(1 - \frac{2C_s}{C_f}\right) = -2\frac{A}{V}K_{OL}t \quad (6)$$

$$K_{OL}^{-1} = k_{L1}^{-1} + k_m^{-1} + k_{L2}^{-1} \quad (7)$$

The mass-transfer resistances  $k_{L1}^{-1}$  and  $k_{L2}^{-1}$  in the overall mass transfer resistance  $K_{OL}^{-1}$  can be neglected because of the sufficiently turbulent conditions in the two diffusion cells during the experiment.  $K_{OL}^{-1}$  did not depend on the stirring rate, therefore it directly indicates the membrane mass-transfer coefficient ( $k_m = Deff l^{-1}$ ). The effective diffusion coefficient in the membrane ( $Deff$ ) was evaluated from  $k_m$ . The initial membrane thickness  $l$  in the swollen state was measured with a micrometer.

The mass-transfer characteristics were evaluated from the effective diffusion coefficient estimated by measuring the mass-transfer rate in the composite membrane. Water-soluble components were employed to determine the size of the transfer channel in the membrane. The reference molecular size was from 60 to 1017Da indicating Urea, Glucose, Methyl Orange, Indigo Carmine, Bordeaux S, Brilliant Blue, and Rose Bengal (Table 2). The diffusion coefficient ( $D_w$ ) in the bulk aqueous phase was estimated by Wilke & Chang's correlation (Eq. (5)). The effective diffusion coefficient in the membrane ( $Deff$ ) was lower than  $D_w$  due to diffusion channels in the composite membranes (Fig. 11).



**Figure 11.** Effect of molecular weight on the effective diffusion coefficient of a  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane.

The effective diffusion coefficient in the membrane ( $D_{eff}$ ) changed dramatically by 15,000-fold in molecular weight when molecular weight only changed by 17-fold. The effective diffusion coefficients of the components of lower molecular weight strongly depended on the  $\kappa$ -carrageenan fraction  $F_C$ .  $D_{eff}$  evidently decayed under lower  $F_C$  conditions. The large dependence of  $D_{eff}$  on  $F_C$  suggests that the polymer framework becomes denser with lower  $F_C$ . In addition, there was a steep change of the effective diffusion coefficient between Methyl Orange and Indigo Carmine in each type of composite membrane. The authors therefore speculated that the mass-transfer channel was monodisperse and almost equivalent to the molecular size (11Å) of Methyl Orange.

## 7. Water permeability

In pressure-driven membrane separation processes such as RO and NF, solvent permeability estimation has to consider the series of resistances to fluid flux, including the membrane resistance and the boundary layer proposed, to explain the mass transfer and the hydrodynamic permeability in these processes [82]. The mass transfer inside the membrane in the absence of any osmotic effect using pure solvent (pure water) as feed indicated the moisture sensitivity of polymers. Permeability should be a more reliable indicator [83-84]. Enhancement of water permeability of the filtration membrane reduces the cost of modules used.

Goldstick [85] argued that water permeation flux in membranes follows Darcy's law for hydrodynamic flow through porous media but with swelling-pressure gradients driving the transport. In 1856, Darcy observed that the rate of flow of water through a bed of given thickness could be related to the driving pressure  $\Delta P$  by the simple expression.

$$\frac{1}{A} \cdot \frac{dV}{dt} = J = \frac{\Delta P}{\eta R_m} \quad (8)$$

where  $J$  is the volumetric flux (of volume  $V$  permeating in time  $t$  through cross-section area  $A$ ,  $m^3/m^2s$ ) for the pressure gradient ( $\Delta P$ , Pa) and the viscosity of the fluid ( $\eta$ , Pas);  $R_m$  refers to the permeability of the clean porous media. The resistance model is based on Darcy's law, which states that water flux through a membrane is proportional to the pressure gradient across the medium and the permeability of the medium.

If there is no fouling (clean membrane), if feed water is completely free of any solutes, and assuming laminar flow through capillary tubes of radius  $r$ , the Hagen–Poiseuille law was obtained.

$$J = \frac{\epsilon r^2}{8\eta\tau} \frac{\Delta P}{\Delta x} \quad (9)$$

where

$\epsilon$  = void fraction of the membrane (void was assumed to be cylindrical pores) ( $n\pi r^2$  / surface area)

$n$  = number of pores

$r$  = pore radius [m]

$\eta$  = viscosity [Pa s]

$\tau$  = tortuosity factor

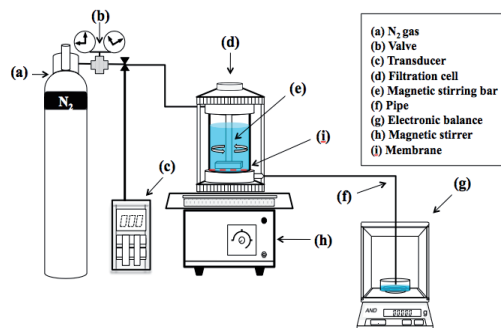
$\Delta P$  = trans-membrane pressure [Pa]

$\Delta x$  = membrane thickness [m]

Flux is proportional to porosity, pore size, and trans-membrane pressure.

To study the performance of prepared membranes, pure-water permeability through a  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane was measured under steady-state conditions. Prior to the experiments, the membranes were immersed in pure water for 12h and then cut into the desired size needed for fixing in a pure water permeability set-up.

The pure-water permeability experiment used a filtration cell with a volume of 200mL and effective filtration area of 21cm<sup>2</sup>. A magnetic stirring bar was installed on the membrane upper surfaces. The filtration cell was employed for constant-flux, constant-pressure filtration. For operation in the constant-flux mode, a nitrogenous gas pump was connected to the inlet of the filtration cell and pumped the permeation water from the outlet. A pressure transducer was installed between the filtration cell and the pump in order to monitor the variation in applied pressure during filtration. The weight of the filtration water was logged by an electronic balance. The schematic of the module and set-up is presented in Fig. 12. In this chapter, the pure-water permeability was measured at different pressures and using Eq. 10.

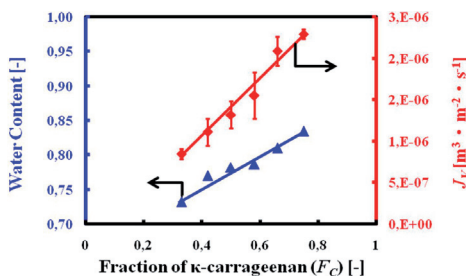


**Figure 12.** Schematic diagram of filtration cell used to measure steady pure-water permeability through the membranes.

$$J_V = \frac{V_p}{A\Delta t} \tag{10}$$

Here,  $J_V$  is the water flux [ $\text{m}^3 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ],  $V_p$  is the volumetric amount of permeated water [ $\text{m}^3$ ],  $A$  is the membrane area [ $\text{m}^2$ ], and  $\Delta t$  is the sampling time [s].

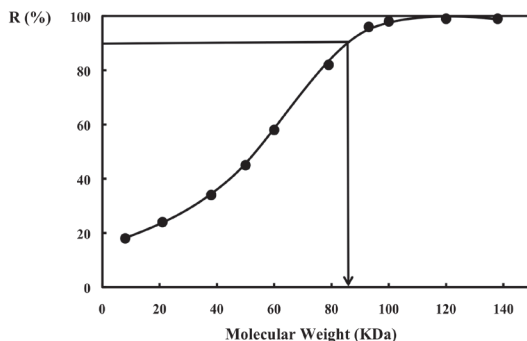
The pure-water flux was measured as a function of applied pressure to investigate the stability and hydraulic properties of biopolymer membranes. In Fig. 13, the water flux and content increased linearly with increasing  $F_C$ . The result agreed with the general trend of water permeation in a hydrophilic membrane: higher water content induced higher water flux.



**Figure 13.** Change of the water flux (150KPa, 298K) and the water content of the membrane with regulated  $F_C$  values.

### 7.1. Obtaining the selectivity curve and molecular weight cutoff

The selectivity of a membrane is usually represented by its molecular weight cutoff [86], defined as the minimum molar mass of a test solute that is 90% retained (or 95% depending on the manufacturer) by the membrane. It is thus determined experimentally from a plot of the variation of the retention rate for tracer molecules according to their molar mass (i.e., from the selectivity (or sieving) curve) (Fig. 14).

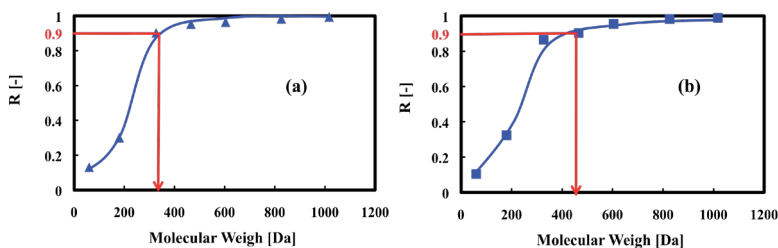


**Figure 14.** Example of a selectivity curve. The molecular weight cutoff, i.e., the molecular weight of a molecule rejected at 90% by the membrane is 83 kDa.

To determine a cutoff threshold, an intrinsic characteristic of the biopolymer membrane only, it is essential that the operating conditions (trans-membrane pressure, tangential circulation speed, etc.) should not affect the retention data. The rejection used for molecular weight cutoff evaluation was defined as follows.

$$R = \frac{\text{FeedConc.}-\text{PermeatConc.}}{\text{FeedConc.}} \quad (11)$$

Figure 15 presents the effect of  $F_C$  on the molecular weight cutoff of the  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membranes. The molecular weight cutoff and the flux of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membranes increased with increasing  $F_C$  (Fig. 15). The molecular cutoff of  $F_C$ 0.33 ( $F_C$ 0.66) membrane was 327Da (466Da). The retention for high-molecular-weight tracers above 604Da was 96 to 98%.



**Figure 15.** The selective curve of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane for dye molecules. (a):  $F_C$  0.33 membrane, (b):  $F_C$  0.66 membrane.

## 8. Conclusions

There are increasing reports on the physicochemical behavior of well-characterized biopolymer systems based on the fundamentals of gelation, and component interactions in the bulk and at interfaces. It appears, however, that a gap has emerged between the recent advances in fundamental knowledge and the direct application to products with a growing need for scientific input. As can be seen from the above, biopolymers are now one of the most explored potential materials for membrane-separation technology, but there is much experimental and theoretical work left to complete. An analysis of the structure–property relationships provides much information on the effects of side groups, structure, and stiffness of the main chains that can be used in directed search for advanced membrane materials of other classes. Much more interesting results have been obtained for composite and modified biopolymers. Here, significantly fewer structures have been examined, so much is yet to be done.

Biopolymer  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane was successfully prepared by the casting method. It has sufficient mechanical strength for practical use and excellent mass-transfer characteristics, especially for molecular-size screening. The relationship between

mass-transfer characteristics and the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan in the composite membrane was formulated based on mass-transfer flux and pure-water flux experiments. The results provided a novel and simple method of preparing membranes and mass-transfer channels based on molecular-size indicators, and suggested that different  $F_c$  values significantly affect the mass-transfer permeability. The water permeation flux as a function of applied pressure provided valuable technical information for investigating the stability and hydraulic properties of the composite membranes. It was concluded that  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membranes with a cross-linked hydrophilic structure exhibited high selectivity and high water flux. Thus, mass-transfer investigations are very useful and informative for studying and analyzing composite membranes.

## Acknowledgements

This work was supported by research funding grants provided by the Iijima Memorial Foundation for the Promotion of Food Science and Technology. The authors sincerely thank Dr. Kei Tao of Nihon University, who provided technical assistance on SEM photography.

## Author details

Peng Wu and Masanao Imai\*

\*Address all correspondence to: [XLT05104@nifty.com](mailto:XLT05104@nifty.com)

Course in Bioresource Utilization Sciences, Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon University, Japan

## References

- [1] Krishna, R. K. S. V., Vijaya, B., Naidu, K., Subha, M. C. S., Sairam, M., Mallikarjuna, N. N., & Aminabahi, T. M. (2006). Novel carbohydrate polymeric blend membranes in pervaporation dehydration of acetic acid. *Carbohydrate Polymer*, 66, 345-351.
- [2] Stanek, L. G., Heilmann, S. M., & Gleason, W. B. (2006). Preparation and copolymerization of a novel carbohydrate containing monomer. *Carbohydrate Polymer*, 65, 552-556.
- [3] Lee, K. P., Arnot, T. C., & Mattia, D. (2011). A review of reverse osmosis membrane materials for desalination-Development to date and future potential. *Journal of Membrane Science*, 370, 1-22.
- [4] Catherine, C. (2009). A review of membrane processes and renewable energies for desalination. *Desalination*, 245, 214-231.

- [5] Guessasma, S., Hamdi, A., & Lourdin, D. (2009). Linear modeling of biopolymer systems and related mechanical properties. *Carbohydrate Polymer*, 76, 381-388.
- [6] Imeson, A. (2009). Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents. Wiley-Blackwell, 343, 10.1002/9781444314724.
- [7] Kumar, A., Srivastava, A., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2007). Smart polymer: Physical forms and bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.*, 32, 1205-1237.
- [8] Clark, A. H. (1996). Biopolymer gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1, 712-717.
- [9] McCray, S. B., Vilker, V. L., & Nobe, K. (1991). Reverse osmosis cellulose acetate membranes. I. Rate of hydrolysis. *Journal of Membrane Science*, 59, 305-316.
- [10] Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31, 603-632.
- [11] Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer Science*, 34, 641-678.
- [12] Lee, Y. M., & Shin, E. M. (1991). Pervaporation separation of water-ethanol through modified chitosan membranes. IV. Phosphorylated chitosan membranes. *Journal of Membrane Science*, 64, 145-152.
- [13] Won, W., Feng, X. S., & Lawless, D. (2002). Pervaporation with chitosan membranes: separation of dimethyl carbonate/methanol/water mixtures. *Journal of Membrane Science*, 209, 493-508.
- [14] Devi, D. A., Smitha, B., Sridhar, S., & Aminabhavi, T. M. (2005). Pervaporation separation of isopropanol/water mixtures through crosslinked chitosan membranes. *Journal of Membrane Science*, 262, 91-99.
- [15] Huang, X. J., Ge, D., & Xu, Z. K. (2007). Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*, 43, 3710-3718.
- [16] Beppu, M. M., Vieira, R. S., Aimoli, C. G., & Santana, C. C. (2007). Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. *Journal of Membrane Science*, 301, 126-130.
- [17] Zeng, X. F., & Ruckenstein, E. (1998). Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations. *Journal of Membrane Science*, 148, 195-205.
- [18] Takahashi, T., Imai, M., Suzuki, I., & Sawai, J. (2008). Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 485-491.
- [19] Takahashi, T., Imai, M., & Suzuki, I. (2007). Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. *Biochemical Engineering Journal*, 36, 43-48.



- [20] Kashima, K., Imai, M., & Suzuki, I. (2010). Superior molecular size screening and mass-transfer characterization of calcium alginate membrane. *Desalination and water treatment*, 17, 143-159.
- [21] Kashima, K., & Imai, M. (2011). Dominant impact of the  $\alpha$ -L-guluronic acid chain on regulation of the mass transfer character of calcium alginate membranes. *Desalination and water treatment*, 134, 257-265.
- [22] El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18, 1-25.
- [23] Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2007). Marine biotechnology for production of food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 237-292.
- [24] Millane, R. P., Chandrasekaran, R., & Arnott, S. (1988). The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan. *Carbohydrate Research*, 183, 1-17.
- [25] Dea, I. C. M., Mckinnon, A. A., & Rees, D. A. (1972). Tertiary and Quaternary Structure in Aqueous Polysaccharide Systems which Model Cell Wall Cohesion: Reversible Changes in Conformation and Association of Agarose, Carrageenan and Galactomannans. *Journal of Molecular Biology*, 68, 153-172.
- [26] Bixler, H. J., Johndro, K., & Falshaw, R. (2001). Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts II. Performance in two simulated dairy applications. *Food Hydrocolloids*, 15, 619-630.
- [27] Falshaw, R., Bixler, H. J., & Johndro, K. (2001). Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts I. Structure analysis. *Food Hydrocolloids*, 15, 441-452.
- [28] Ekstrom, A. G., & Kuivinen, J. (1983). Molecular weight distribution and hydrolysis behaviour of carrageenans. *Carbohydrate Research*, 116, 89-94.
- [29] El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18, 1-25.
- [30] Mangione, M. R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., Cavallaro, G., & San Biagio, P. L. (2005).  $K^+$  and  $Na^+$  effects on the gelation properties of k-Carrageenan. *Biophysical Chemistry*, 113, 129-135.
- [31] Leathers, T. D. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 62, 468-473.
- [32] Ueda, S., Fujita, K., Komatsu, K., & Nakashima, Z. (1963). Polysaccharide produced by the genus Pullularia I. Production of polysaccharide by growing cells. *Applied Microbiology*, 11, 211-215.
- [33] Singh, R. S., Saini, G. K., & Kennedy, J. F. (2008). Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73, 515-531.

- [34] Xiao, Q., Lim, L. T., & Tong, Q. (2011). Properties of pullulan-based blend film as affected by alginate content and relative humidity. *Carbohydrate Polymers*, 87, 227-234.
- [35] Shih, F. F., Daigle, K. W., & Champagne, E. T. (2011). Effect of rice wax on water vapour permeability and sorption properties of edible pullulan films. *Food Chemistry*, 127, 118-121.
- [36] Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., & Kontogiorgos, V. (2003). Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polymers*, 52, 151-166.
- [37] Trinetta, V., Cutter, C. N., & Floros, J. D. (2011). Effects of ingredient composite on optical and mechanical properties of pullulan film for food-packaging applications. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 2296-2301.
- [38] Ulbricht, M. (2006). Advanced functional polymer membranes. *Polymer*, 47, 2217-2262.
- [39] Lebrun, L., Blanco, J. F., & Metayer, M. (2005). Preparation of ion-exchange membranes using pullulan as polymer matrix. *Carbohydrate Polymers*, 61, 1-4.
- [40] Datta, S., Mody, K., Gopalsamy, G., & Jha, B. (2011). Novel application of  $\kappa$ -carrageenan: As a gelling agent in microbiological media to study biodiversity of extreme alkaliphiles. 85, 465-468.
- [41] Wu, P., & Imai, M. (2011). Food polymer pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane performed smart function both on mass transfer and molecular size recognition. *Desalination and Water Treatment*, 34, 239-245.
- [42] Sairam, M., Sereewatthanawut, E., Li, K., Bismarck, A., & Livingston, A. G. (2011). Method for the preparation of cellulose acetate flat sheet composite membranes for forward osmosis-Desalination using  $\text{MgSO}_4$  draw solution. *Desalination*, 273, 299-307.
- [43] Miao, J., Chen, G., Gao, C., & Dong, S. X. (2008). Preparation and characterization of N,O-carboxymethyl chitosan/Polysulfone composite nanofiltration membrane cross-linked with epichlorohydrin. *Desalination*, 233, 147-156.
- [44] Peeva, P. D., Million, N., & Ulbricht, M. (2012). Factors affecting the sieving behavior of anti-fouling thin-layer cross-linked hydrogel polyethersulfone composite ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 390-391, 99-112.
- [45] Elimelech, M., Zhu, X. H., Childress, A. E., & Hong, C. S. (1997). Role of membrane surface morphology in colloidal fouling of cellulose acetate and composite aromatic polyamide reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science*, 127, 101-109.
- [46] Zio, A. D., Prisciandaro, M., & Barda, D. (2005). Disinfection of surface waters with UF membranes. *Desalination*, 179, 297-305.
- [47] Singh, G., Rana, D., Matsuura, T., Ramakrishna, S., Narbaitz, R. M., & Tabe, S. (2010). Removal of disinfection byproducts from water by carbonized electrospun nanofibrous membranes. *Separation and Purification Technology*, 74, 202-212.

- [48] Lameloise, M., Matinier, H., & Fargues, C. (2009). Concentration and purification of malate ion from a beverage industry waste water using electrodialysis with homopolar membranes. *Journal of Membrane Science*, 343, 73-81.
- [49] Yushina, Y., & Hasegawa, J. (1994). Process performance comparison of membrane introduced anaerobic digestion using food industry waste water. *Desalination*, 98, 413-421.
- [50] Blocher, C., Noronha, M., Funfrocken, L., Dorda, J., Mavrov, V., Janke, H. D., & Chmiel, H. (2002). Recycling of spent process water in the food industry by an integrated process of biological treatment and membrane separation. *Desalination*, 144, 143-150.
- [51] Alp, B., Mutltu, S., & Mutlu, M. (2000). Glow-discharge-treated cellulose acetate (CA) membrane for a high linearity single-layer glucose electrode in the food industry. *Food Research International*, 33, 107-112.
- [52] Kabay, N., Bryjak, M., Schlosser, S., Kitis, M., Avlonitis, S., Matejka, Z., Al-Mutaz, I., & Yuksel, M. (2008). Adsorption-membrane filtration (AMF) hybrid process for boron removal from seawater: an overview. *Desalination*, 223, 38-48.
- [53] Redondo, J., Busch, M., & Witte, J. D. (2003). Boron removal from seawater using FILMTECTM high rejection SWRO membranes. *Desalination*, 156, 229-238.
- [54] Hu, J. H., Song, L. F., Ong, S. L., Phua, E. T., & Ng, W. J. (2005). Biofiltration pretreatment for reverse osmosis (RO) membrane in a water reclamation system. *Chemosphere*, 59, 127-133.
- [55] Alvarez-Hornos, F. J., Volckaert, D., Heynderickx, P. M., & Langenhove, H. V. (2011). Performance of a composite membrane bioreactor for the removal of ethyl acetate from waste air. *Bioresource Technology*, 102, 8893-8898.
- [56] Zheng, X., & Liu, J. (2006). Dyeing and printing wastewater treatment using a membrane bioreactor with a gravity drain. *Desalination*, 190, 277-286.
- [57] Su, M., Teoh, M. M., Wang, K. Y., Su, J. C., & Chung, T. S. (2010). Effect of inner-layer thermal conductivity on flux enhancement of dual-layer hollow fiber membranes in direct contact membrane distillation. *Journal of Membrane Science*, 364, 278-289.
- [58] Shah, B. G., Shahi, V. K., Thampy, S. K., Rangarajan, R., & Ghosh, P. K. (2009). Comparative studies on performance of interpolymer and heterogeneous ion-exchange membranes for water desalination by electrodialysis. *Desalination*, 172, 257-265.
- [59] Misdan, N., Lau, W. J., & Ismail, A. F. (2012). Seawater Reverse Osmosis (SWRO) desalination by thin-film composite membrane-Current development, challenges and future prospects. *Desalination*, 287, 228-237.
- [60] Maguire-Boyle, S. J., & Barron, A. R. (2011). A new functionalization strategy for oil/water separation membranes. *Journal of Membrane Science*, 382, 107-115.

- [61] Steward, P. A., Hearn, J., & Wilkinson, M. C. (2000). An overview of polymer latex film formation and properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 86, 195-267.
- [62] Tong, Q., Xiao, Q., & Lim, L. T. (2008). Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. *Food Research International*, 41, 1007-1014.
- [63] Martelli, S. M., Moore, G. R. P., & Laurindo, J. B. (2006). Mechanical Properties, Water Vapor Permeability and Water Affinity of Feather Keratin Films Plasticized with Sorbitol. *J. Polym. Environ.*, 14, 215-222.
- [64] Rao, P. S., Smitha, B. S., Sridhar, S., & Krishnaiah, A. (2006). Preparation and performance of poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine blend membranes for the dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation: Comparison with glutaraldehyde cross-linked membranes. *Separation and Purification Technology*, 48, 244-254.
- [65] Takahashi, T., Imai, M., & Suzuki, I. (2008). Cellular structure in an N-acetyl-chitosan membrane regulate water permeability. *Biochemical Engineering Journal*, 42, 20-27.
- [66] McCray, S. B., Vilker, V. L., & Nobe, K. (1991). Reverse osmosis cellulose acetate membranes. I. Rate of hydrolysis. *Journal of Membrane Science*, 59, 305-316.
- [67] Vasileva, N., & Godjevargova, T. (2004). Study on the behaviour of glucose oxidase immobilized on microfiltration polyamide membrane. *Journal of Membrane Science*, 239, 157-161.
- [68] Villegas, M., Vidaurre, E. F., Habert, A. C., & Gottifredi, J. C. (2011). Sorption and pervaporation with poly(3-hydroxybutyrate) membranes: methanol/methyl tert-butyl ether mixtures. *Journal of Membrane Science*, 367, 103-109.
- [69] Matsuoka, Y., Kanda, N., Lee, Y. M., & Higuchi, A. (2006). Chiral separation of phenylalanine in ultrafiltration through DNA-immobilized chitosan membranes. *Journal of Membrane Science*, 280, 116-123.
- [70] Papageorgiou, S. K., Katsaros, F. K., Favvas, E. P., Romanos, G. E., Athanasekou, C. P., Beltsios, K. G., Tziaila, O. I., & Falaras, P. (2012). Alginate fibers as photocatalyst immobilizing agents applied in hybrid photocatalytic/ultrafiltration water treatment processes. *Water Research*, 46, 1858-1872.
- [71] Miao, J., Chen, G. H., & Gao, C. J. (2005). A novel kind of amphoteric composite nanofiltration membrane prepared from sulfated chitosan (SCS). *Desalination*, 181, 173-183.
- [72] Li, X. L., Zhu, L. P., Zhu, B. K., & Xu, Y. Y. (2011). High-flux and anti-fouling cellulose nanofiltration membranes prepared via phase inversion with ionic liquid as solvent. *Separation and Purification Technology*, 83, 66-73.
- [73] Wu, J., & Yuan, Q. (2002). Gas permeability of a novel cellulose membrane. *Journal of Membrane Science*, 204, 185-194.

- [74] Xiao, S., Feng, X. S., & Huang, R. Y. M. (2007). Trimesoyl chloride crosslinked chitosan membranes for CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> separation and pervaporation dehydration of isopropanol. *Journal of Membrane Science*, 306, 36-46.
- [75] Feil, H., Bae, Y. H., Feijen, J., & Kim, S. W. (1991). Molecular separation by thermo-sensitive hydrogel membranes. *Journal of Membrane Science*, 64, 283-294.
- [76] Peppas, N. A., & Reinhart, C. (1983). Solute Diffusion in Swollen Membranes. Part I. A New Theory. *Journal of Membrane Science*, 15, 275-287.
- [77] Baltus, R. E. (1997). Characterization of the pore area distribution in porous membranes using transport measurements. *Journal of Membrane Science*, 123, 165-184.
- [78] Krajewska, B., & Olech, A. (1996). Pore structure of gel chitosan membranes. I. Solute diffusion measurements. *Polymer Gels and Networks*, 4, 33-43.
- [79] Neogi, P. (1996). Diffusion in Polymer. Marcel Dekker, 309.
- [80] Chen, C. X., Han, B. B., Li, J. D., Shang, T. G., & Jiang, W. J. (2001). A new model on the diffusion of small molecule penetrants in dense polymer membranes. *Journal of Membrane Science*, 187, 109-118.
- [81] Miyabe, K., & Isogai, R. (2011). Estimation of molecular diffusivity in liquid phase systems by the Wilke-Chang equation. *Journal of Chromatography A*, 1218, 6639-6645.
- [82] Mehdizadeh, H., Molaiee-Nejad, K., & Chong, Y. C. (2005). Modeling of mass transport of aqueous solutions of multi-solute organics through reverse osmosis membranes in case of solute-membrane affinity Part 1. Model development and simulation. *Journal of Membrane Science*, 267, 27-40.
- [83] Yaroshchuk, A. E. (1995). Solution-diffusion-imperfection model revised. *Journal of Membrane Science*, 101, 83-87.
- [84] Yaroshchuk, A. E. (1995). The role of imperfections in the solute transfer in nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 239, 9-15.
- [85] Fatt, I., & Goldstick, T. K. (1965). Dynamics of water transport in swelling membranes. *J. Colloid Sci.*, 20, 962-989.
- [86] Jonsson, G. (1985). Molecular weight cut-off for ultrafiltration membranes of varying pore size. *Desalination*, 53, 3-10.

20<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2012  
25 – 29 August 2012, Prague, Czech Republic

## Outstanding molecular size recognition and regulation of water permeability on $\kappa$ -carrageenan-pullulan membrane involved in synergistic design of composite polysaccharides-structure

P. Wu, M. Imai a\*

*Graduate School of Bioresource Sciences, Course in Bioresource Utilization Sciences, Nihon University,  
1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa-pref. 252-0880, Japan.*

---

### Abstract

Marine biopolymer  $\kappa$ -carrageenan-pullulan composite membrane was successfully prepared. Novel function of polysaccharides ( $\kappa$ -carrageenan ( $\kappa$ C) and pullulan (P)) in membrane formation and molecular size screening effect was successfully demonstrated. The mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ) was a key factor to determine membrane character not only on mechanical strength but also on selected molecular mass transfer. It was defined as the following equation:  $F_C \equiv (\kappa C[g]/(P[g] + \kappa C[g]))$  and changed in desired range (0.33–0.83). The optimum condition was 70mM glutaraldehyde for crosslinking and followed the 0.7M potassium chloride-immersion. The water content was measured and linearly depended on  $F_C$ . The water permeability of composite membrane was determined from the water mass flux throughput by an ultra-filtration apparatus. The effect of the  $F_C$  value on the water flux and water content was investigated. The correlation between the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan ( $F_C$ ) and the volumetric water flux at 0.15MPa appeared the strong dependency on the  $F_C$  values. It suggested that a higher permeation mechanism of water results from higher water content in the composite membrane. Five anionic organic chemicals of molecular weights ranging from 327 to 1017Da were used in mass transfer examination through the composite membrane. Outstanding molecular size recognition based on the effective diffusion coefficient was appeared. The membrane molecular weight cut-off was established experimentally.

© 2012 Published by Elsevier Ltd. Selection under responsibility of the Congress Scientific Committee (Petr Kluson)

---

\*Corresponding author. Tel.: +81-466-84-3978; fax: +81-466-84-3978.  
E-mail address: [XLT05104@nifty.com](mailto:XLT05104@nifty.com)

*Keywords:*  $\kappa$ -Carrageenan; Pullulan; Composite membrane; Mass Transfer; Diffusion coefficient; Water permeability.

## 1. Introduction

In recent years, the desire for bio-polymeric materials, which demonstrate in high-degreed applications, has grown significantly. Use of biopolymer in place of artificial polymers has been increasing and due to stringent environment regulations [1]. The development of the new-generation materials that extend the industrial applications of membrane processes will require a high level of control of the characteristics of the base polymeric support layer [2]. Current research in membrane science is now focusing more on the biopolymers which from natural raw material with well-defined structure to develop new membrane materials [3]. Additionally, biopolymers can be sustainable, carbon neutral and are always renewable, because of they are made from sea/land plant materials, which can be grown year on year indefinitely. The novel biopolymer membranes allow separations based on Fick's diffusion law and other driving forces like charge and physical/chemical interactions, and with appropriate functional groups can provide applications ranging from tunable water permeation and separations, toxic metal capture, toxic organic dechlorination, biocatalysis, and others [4-5].

Biopolymers as stabilizers, thickeners and gelling agents were extracted from various raw materials. They regulate a number of critical functions including moisture binding and control, structure and flow behavior that enables organism to thrive in a nature environment [6]. A number of the typical biopolymers from natural raw materials such as alginate, cellulose, chin/chitosan, and other synthetic polymers use for functional materials (e.g., carriers for controlled drug release, membrane with regulated permeability, and sensor devices, artificial muscles). For these purposes, high cooperativity of response to the change in external conditions and developed internal microstructure of the gels is required. Interest in the behavior of biopolymer gels and networks has grown significantly over the past decades. The various water-soluble polymers that can be used for membrane formation are also discussed at length.

Up to now, various novel membrane materials and systems have been designed and developed. Worldwide, considerable effort is being deployed to develop biopolymer membrane materials. The technological benefits of such membrane materials and systems have begun to be identified and demonstrators are under construction for a wide range of applications from controlled drug delivery, to chemical separation, to water treatment, to bio-separation, to chemical sensors, to chemical valves, to tissue engineering, etc. In the field of biopolymer membrane materials and systems, the following two topics will be the main focus of research in the future. One is the development of novel and efficient biopolymer membrane materials and the other is the enhancement of biopolymer membrane processes [7].

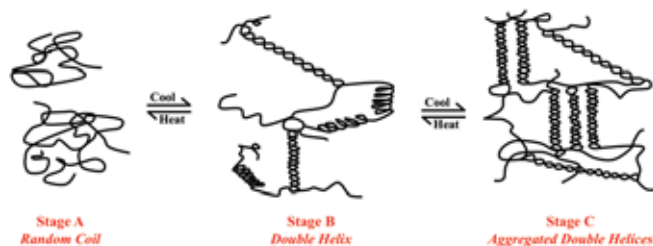


Fig. 1. Models of conformational transition of  $\kappa$ -carrageenan and  $\iota$ -carrageenan

Carrageenans are large, highly flexible molecules that curl forming helical structures. They are widely used in the food and other industries as thickening and stabilizing agents. Carrageenans consist of alternating copolymers of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactose and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anhydro-D- or L-galactose. Several isomers of carrageenan are known as kappa, iota, and lambda-carrageenan, and they differ in the number and position of the ester sulfate groups on the repeating galactose units.  $\kappa$ -Carrageenan has only one negative charge per disaccharides with a tendency of forming a strong and rigid gel. The gelling power of  $\kappa$ -carrageenans imparts excellent film forming properties, and additionally forms a firm gel with potassium ions. Hot solutions of  $\kappa$ -carrageenans set when cooled below the gel point, which is between 30°C and 70°C, depending on the cations and other ingredients present, to form a range of gel textures. The two-step gel mechanism is shown in Fig. 1, with stage B phase being elastic (iota) and stage C phase being brittle (kappa).

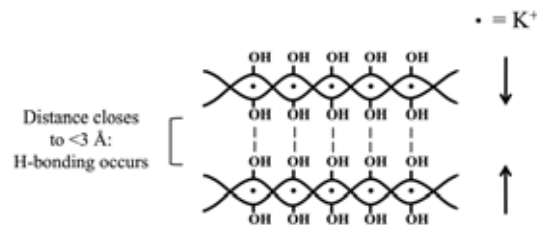


Fig. 2. The gelation mechanism of  $\kappa$ -carrageenan crosslinked by K<sup>+</sup> ions

$\kappa$ -Carrageenan selects potassium ions to stabilize the junction zones within the characteristically firm, brittle gel. Potassium ions counter sulphate charges without sterically hindering close approach and double helix formation (Fig.2) [8-14]. Pullulan is an extracellular glucan elaborated by a fungus of the genus *Aureobasidium*, commonly called 'black yeast'. The structure of pullulan is a linear glucan consisting of repeating units of maltotriose joined by  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) linkages. The safety of pullulan in foods is supported by its chemical composition, the purity of the final product, a series of toxicological studies and the fact that it has a long history of use of about 30 years as a food ingredient in human foods in Japan [15-17]. Recently, the demand of pullulan has rapidly increased for films and hard capsules, and its use in these fields is expected to grow [18-19]. The major interest in pullulan relies on its capacity to form strong resilient films and fibers [20]. Pullulan could be used on its own or combined with other thickeners or gelling agents. The stringiness of pullulan may be a disadvantage for some applications, but this can be prevented by adding a small amount of another polysaccharide such as carrageenan or xanthan gum [21]. Combinations of  $\kappa$ -carrageenan and pullulan give gel strengths and elasticity intermediate to the two extremes and in line with the ratio used (Fig.3).



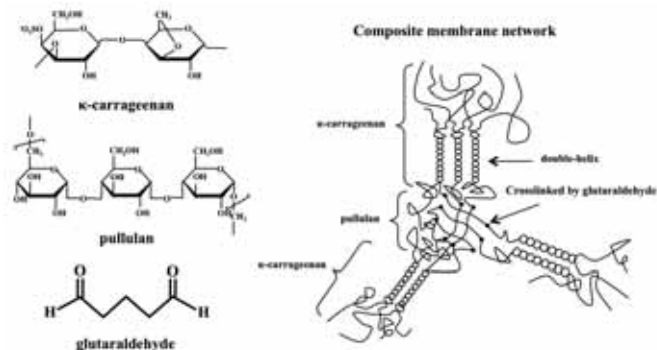


Fig. 3. Schematic representation of composite  $\kappa$ -carrageenan-pullulan chains.

This study successfully demonstrated the novel function of polysaccharides ( $\kappa$ -carrageenan and pullulan) in membrane formation and molecular size screening effect. The  $\kappa$ -carrageenan mass fraction ( $F_C$ ) was a key factor to determine membrane character not only on mechanical strength but also on selected molecular mass transfer.

## 2. Materials

Pullulan was provided by Hayashibara Biochemical Laboratory (Okayama, Japan).  $\kappa$ -carrageenan and glutaraldehyde were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Urea (MW 60Da), Glucose (MW 180Da), Methyl Orange (MW 327.34Da), and Bordeaux S (MW604.48Da) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Brilliant Blue (MW 826.0Da) was purchased from Sigma Chemical Co. (Perth, WA). Indigo Carmine (MW 466.37Da) was purchased from Kokusan Chemical Works, Ltd. (Tokyo, Japan).

## 3. Experimental

### 3.1. Membrane Preparation

$\kappa$ -Carrageenan and pullulan powders were dissolved in distilled water (70°C) using a magnetic stirrer to prepare film-forming solutions of various blend-weight ratios. All polymer solutions were prepared based on 3 g total polymer weight dissolved in 97g of distilled water at 70°C for one hour. In addition, each was stirred for one hour at 70°C with concentration preparation of glutaraldehyde [22] (30 ~ 130mM) was added. The polymer solutions were then cast 20g onto for each petri dish, followed by drying in an electrical blast-drying chest at 65°C for 24 hours. Potassium chloride solution was introduced into the dried membranes (attached to the petri dishes) [23] (0.1 ~ 1.0M) for 24 hours. The swollen membrane was spontaneously peeled from the petri dish at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and washed by pure water cleanly for further testing. Membrane samples were tested in triplicate.

### 3.2. Measurement of membranes' mechanical properties

A rheometer (CR-DX500, Sun Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used to determine the tensile strength and the percentage elongation at break. Three rectangular-strip specimens (10 mm wide, 40 mm long) were cut from each membrane for tensile testing. The initial grip separation was set to 20 mm, and

the crosshead speed was set to 1 mm/s. The initial membrane thickness was measured using a micrometer (Mitutoyo, Kanagawa, Japan). The average thickness of the membrane strip was used to estimate the initial cross-sectional area of the membrane sample. Maximum Stress ( $\sigma$ ) (MPa) was calculated by dividing the maximum load (N) by the cross-sectional area ( $m^2$ ):

$$\sigma = \frac{P}{(b \times d)} \tag{1}$$

where  $P$  is the maximum load (N),  $b$  is the width of sample (m), and  $d$  is the membrane thickness (m). Maximum Strain ( $\lambda$ ) (%) was calculated as follows:

$$\lambda = \frac{(L - L_0)}{(L_0)} \times 100\% \tag{2}$$

where  $L_0$  is the original length of sample before deformation and  $L$  is the final length of sample at break [24].

We set the concentration of glutaraldehyde and potassium chloride-immersion condition at 90mM and 0.7M, respectively. Figure 4 represents the effect of  $F_C$  values on membrane mechanical strength. The maximum stress linearly increased with proportional to  $F_C$  values, and the maximum strain was appeared at 35%.

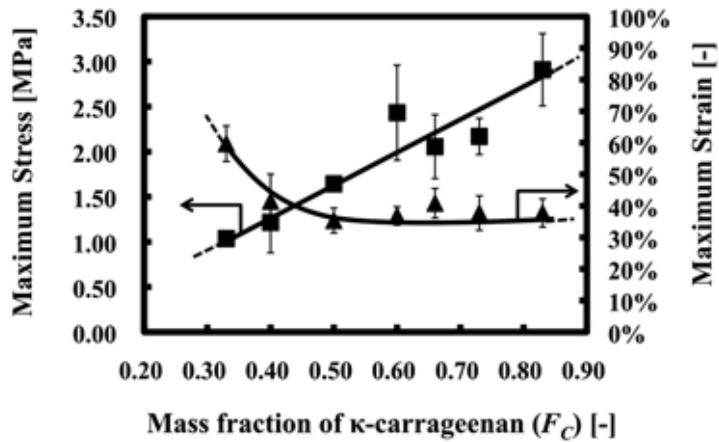


Fig. 4. Effect of  $F_C$  on the maximum stress and the strain of pullulan- $\kappa$ -carrageenan composite membrane. The concentration of GA and KCl were set at 90mM and 0.7M, respectively

### 3.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The membranes were snapped under liquid nitrogen then dried in a vacuum freeze dryer (RLE-103, Kyowa Vacuum Engineering. Co., Ltd., Tokyo, Japan) (298 K) for 24 hours. The membranes were then sputter coated with a thin film of Pt, using a sputter-coater (E-1010 Ion Sputter, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan). Images of cross sections of the membranes were obtained using a scanning electron microscope (Miniscope TM-1000, Hitachi, Ltd.,).

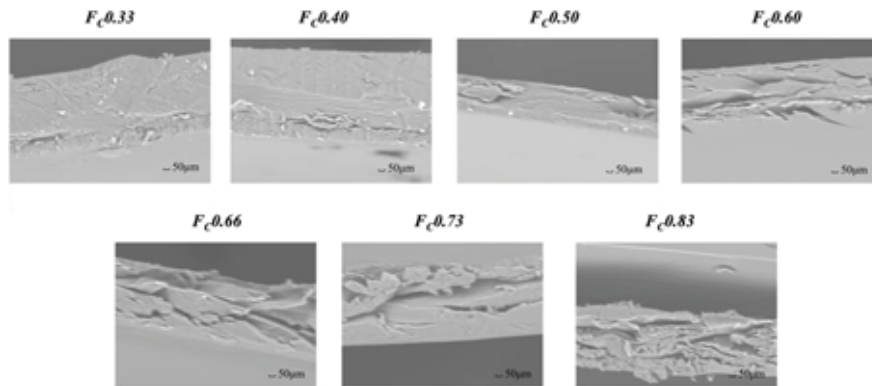


Fig. 5. SEM images of cross-section of  $\kappa$ -carrageenan-pullulan composite membrane

### 3.4. Molecular-Recognizable Membranes

Molecular diffusion experiments were used a mass transfer set-up (Fig.6). The  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane was sandwiched between the two halves of the glass made diffusion cell. The diffusion area was  $24\text{cm}^2$ . One of the diffusion cell was filled with  $190\text{ cm}^3$  of water-soluble solution (1mM) in distilled water, while the other diffusion cell received  $190\text{ cm}^3$  of distilled water. The diffusion of solutes through the membrane was monitored by periodically removing  $1\text{cm}^3$  samples from both diffusion cells and determining the tested solute in the stripping side samples as detailed below. A maximum of 8 samples were withdrawn in the course of an experimental run, which lasted about 12 h. The corresponding changes in solution volumes within the diffusion vessel did not exceed 5%. The schematic mass transfer model was shown in Fig.6.

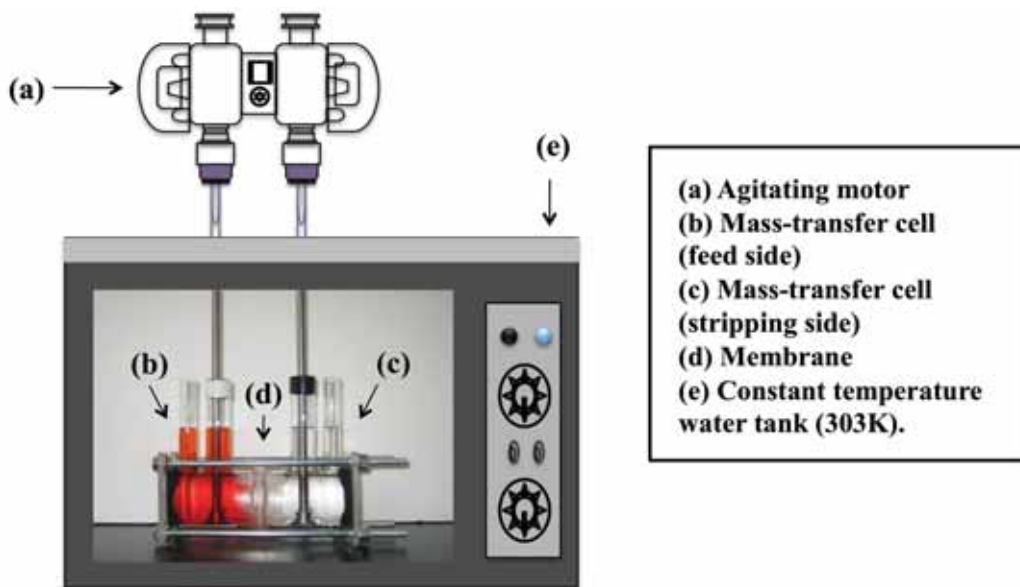


Fig. 6. Schematic diagram of the mass-transfer setup in our experiment

It is supposed that since the concentrations in the two diffusion cells were uniform, the mass-transfer flux was so small that the diffusion process can be regarded as a quasi-steady state. Accordingly, we can use Eqs. (3) and (4) to calculate the effective diffusion coefficients.

$$\ln\left(1 - \frac{2C_s}{C_f}\right) = -2\frac{A}{V}K_{OL}t \tag{3}$$

$$K_{OL}^{-1} = k_{L1}^{-1} + k_m^{-1} + k_{L2}^{-1} \tag{4}$$

The mass-transfer resistances  $k_{L1}^{-1}$  and  $k_{L2}^{-1}$  in the overall mass transfer resistance  $K_{OL}^{-1}$  can be neglected because of the sufficiently turbulent conditions in the two diffusion cells during the experiment.  $K_{OL}^{-1}$  did not depend on the stirring rate, therefore it directly indicates the membrane mass-transfer

coefficient ( $k_m = D_{eff} \cdot l^{-1}$ ). The effective diffusion coefficient in the membrane ( $D_{eff}$ ) was evaluated from  $k_m$ . The initial membrane thickness  $l$  in the swollen state was measured with a micrometer (Mitutoyo, Kanagawa, Japan).

The mass-transfer characteristics were evaluated from the effective diffusion coefficient estimated by measuring the mass-transfer rate in the composite membrane. Water-soluble components were employed to determine the size of the transfer channel in the membrane. The reference molecular size was from 60 to 1017Da indicating Urea, Glucose, Methyl Orange, Indigo Carmine, Bordeaux S, Brilliant Blue and Rose Bengal (Table 3). The diffusion coefficient ( $D_w$ ) in bulk aqueous phase was estimated by Wilke & Chang's correlation. The effective diffusion coefficient in the membrane ( $D_{eff}$ ) was lower than  $D_w$ , due to diffusion channels in the composite membranes (Fig.7).

The effective diffusion coefficient in the membrane ( $D_{eff}$ ) dramatically changed, ranging within molecular weight by 15000-fold in a case where molecular weight only changed by 17-fold. The effective diffusion coefficients of the components of lower molecular weight strongly depended on the  $\kappa$ -carrageenan fraction  $F_C$ . As it appears,  $D_{eff}$  evidently decayed under lower  $F_C$  conditions. The large dependence of  $D_{eff}$  on the  $F_C$  value suggests that the polymer frame-works become denser under lower  $F_C$  conditions. In addition, the steep change of the effective diffusion coefficient between Methyl Orange and Indigo Carmine in the each types of composite membrane was appeared. Authors therefore assumed that the size of the mass transfer channel was almost equivalent to molecular size (approx.11Å) of Methyl Orange, and it was suggested that mass transfer channel size was monodispersity

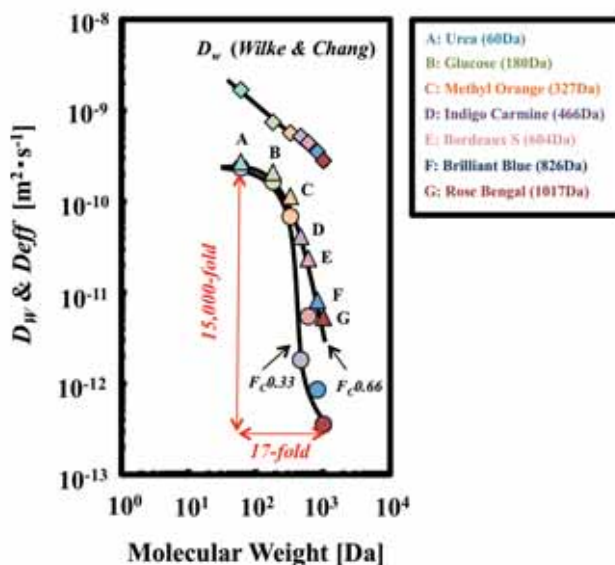


Fig. 7. Effect of molecular weight on the effective diffusion coefficient of a  $\kappa$ -carrageenan/pullulan composite membrane

### 3.5. Water permeability

A pure water permeability experiment used a filtration cell (UHP-62K, ADVANTEC, Ltd., Japan) had a volume of 200mL and effective filtration area of 21cm<sup>2</sup>. A magnetic stirring bar was installed in the membranes upper surface. The filtration cell was employed for both constant flux and constant pressure filtration. For operation in constant flux mode, a nitrogenous gas pump was connected to the inlet of the

filtration cell, and piped the permeation water from the outlet. A pressure transducer was installed between the filtration cell and the pump in order to monitor the variation in applied pressure during filtration. The weight of the filtration water was logged by electronic balance. The schematic representation of module and set-up are shown in Fig.8. On the chapter, pure water permeability experiment was measured at different pressure and using the eq.5:

$$J_V = \frac{V_p}{A\Delta t} \quad (5)$$

where  $J_V$  is the water flux [ $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ],  $V_p$  is the volumetric amount of permeated water [ $\text{m}^3$ ],  $A$  is the membrane area [ $\text{m}^2$ ],  $l$  is the membrane thickness [ $\text{m}$ ], and  $\Delta t$  is the sampling time [ $\text{s}$ ].

The apparent rejection of dye molecules,  $R$  is defined by:

$$R [-] = \left( 1 - \frac{C_p}{C_f} \right) \quad (6)$$

where  $C_p$  is the concentration of permeate and  $C_f$  is the concentration of dye solutions.

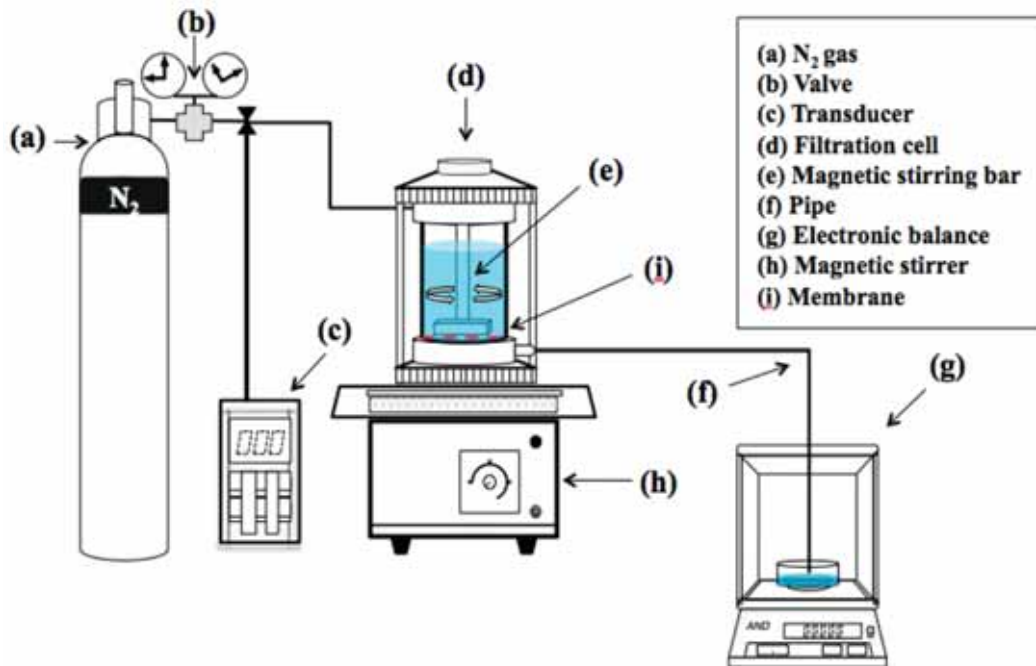


Fig. 8. Schematic diagram of filtration cell used to measure steady pure-water permeability through the membranes

The pure-water flux as a function of applied pressure was measured to investigate the stability and hydraulic properties of biopolymer membranes. In Fig.9, the water flux and water content increased linearly with increasing the  $F_C$  values. In general, higher water content membrane performed higher water

flux. The water flux of composite membrane agreed with it. The mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan linearly regulated both water permeate flux and water content.

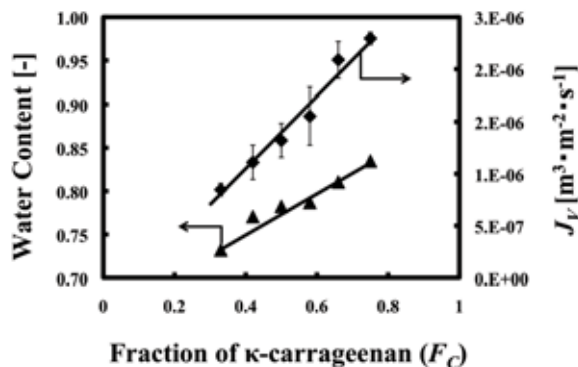


Fig. 9. Change of the water flux (150KPa, 298K) and the water content of the membrane with regulated  $F_C$  values

### 3.6. Obtaining the selectivity curve and molecular weight cutoff

The selectivity of a membrane is usually represented by its molecular weight cutoff [25]. This is defined as the minimum molar mass of a test solute that is 90% retained (or 95% depending on the manufacturer) by the membrane. It is thus determined experimentally from a plot of the variation of the retention rate for tracer molecules according to their molar mass.

Fig.10 shows the effect of  $F_C$  values on the molecular weight cut-off on the  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membranes. With the increase in  $F_C$  values, the molecular weight cut-off and the flux of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membranes increased. It was found that molecular-cut-off values of  $F_C 0.33$  membrane and  $F_C 0.66$  membrane performed the results of 327Da (10.6Å) and 466Da (11.9Å) respectively. For high-molecular-weight dyes above 604Da retention amounted to 96–98%.

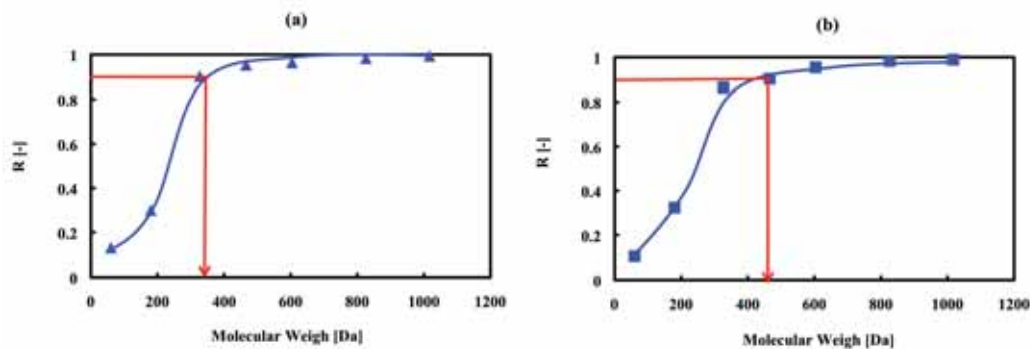


Fig. 10. The selective curve of  $\kappa$ -carrageenan/pullulan membrane for dye molecules. (a):  $F_C 0.33$  membrane, (b):  $F_C 0.66$  membrane

## 4. Conclusions

Biopolymer  $\kappa$ -carrageenan-pullulan composite membrane was successfully prepared by the casting method. It has the sufficient mechanical strength enough for a practical use and the excellent mass

transfer character especially on molecular size screening (60Da ~ 1017Da). The relationship between mass transfer character and the mass fraction of  $\kappa$ -carrageenan in the composite membrane was formulated based on the experiments of mass-transfer flux and pure water flux. The results provided a novel and simple method of preparation membrane and the size of mass-transfer channel based on molecular-size indicators, and suggested that different  $F_C$  values significantly affect the mass-transfer permeability. The water permeation flux as a function of applied pressure provided valuable technical information for investigating the stability and hydraulic properties of the composite membranes.  $\kappa$ -Carrageenan-pullulan composite membrane possessing a cross-linked hydrophilic structure performed high selectivity and high water flux. Thus, the mechanism of mass-transfer investigations is very informative for the study and analysis of composite membrane.

## Acknowledgements

This work was supported by research funding grants provided by the Iijima Memorial Foundation For the Promotion of Food Science and Technology. The authors sincerely thank Dr. Kei Tao of Nihon University, who provided technical assistance on SEM photography.

## Nomenclature

$A$	Area of membrane [ $\text{m}^2$ ].
$C_f$	Initial concentration of feed solution [M].
$C_s$	Concentration of stripping solution [M].
$D_w$	Diffusion coefficient in bulk aqueous phase [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ].
$D_{eff}$	Effective diffusion coefficient [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ].
$J_V$	Water-permeated flux [ $\text{m}^3\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ].
$K_{OL}$	Overall mass-transfer coefficient [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ].
$K_{OL}^{-1}$	Overall mass transfer resistance [ $(\text{m}\cdot\text{s}^{-1})^{-1}$ ].
$k_m$	Membrane mass-transfer coefficient [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ].
$k_{L1}$	Membrane mass-transfer coefficient in feed phase [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ].
$k_{L2}$	Membrane mass-transfer coefficient in stripping phase [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ].
$l$	Membrane thickness [m].
$\Delta P$	Operational pressure [kPa].
$\Delta t$	Time [s].
$V$	Volume of aqueous solution in the transfer cell [ $\text{m}^3$ ].
$W_t$	Total water content ratio [%]



## Reference

- [1] Krishna RKS, Vijaya B, Naidu K, Subha MCS, Sairam M, Mallikarjuna NN, Aminabahi TM. Novel carbohydrate polymeric blend membranes in pervaporation dehydration of acetic acid. *Carbohydrate Polym* 2006;**66**:345-351.
- [2] Stanek LG, Heilmann SM, Gleason WB. Preparation and copolymerization of a novel carbohydrate containing monomer. *Carbohydrate Polym* 2006;**65**:552-556.
- [3] Lee KP, Arnot TC, Mattia D. A review of reverse osmosis membrane materials for desalination-Development to date and future potential. *J Membrane Sci* 2011;**370**:1-22.
- [4] Catherine C. A review of membrane processes and renewable energies for desalination. *Des* 2009;**245**:214-231.
- [5] Guessasma S, Hamdi A, Lourdin D. Linear modeling of biopolymer systems and related mechanical properties. *Carbohydrate Polym* 2009;**76**:381-388.
- [6] Imeson A. *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.; 2009.
- [7] Kumar A, Srivastava A, Galaev IY, Mattiasson B. Smart polymer: Physical forms and bioengineering applications. *Prog Polym Sci* 2007;**32**:1205-1237.
- [8] Millane RP, Chandrasekaran R, Arnott S. The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan. *Carbohydrate Res* 1988;**183**:1-17.
- [9] Dea ICM, Mckinnon AA and Rees DA. Tertiary and Quaternary Structure in Aqueous Polysaccharide Systems which Model Cell Wall Cohesion: Reversible Changes in Conformation and Association of Agarose, Carrageenan and Galactomannans. *J Mol Biol* 1972;**68**:153-172.
- [10] Bixler HJ, Johndro K, Falshaw R. Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts II. Performance in two simulated dairy applications. *Food Hydrocolloids* 2001;**15**:619-630.
- [11] Falshaw R., Bixler H.J., Johndro K. Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts I. Structure analysis. *Food Hydrocolloids* 2001;**15**:441-452.
- [12] Ekstrom AG, Kuivinen J. Molecular weight distribution and hydrolysis behaviour of carrageenans. *Carbohydrate Res* 1983;**116**:89-94.
- [13] El Gamal AA. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm J* 2010;**18**:1-25.
- [14] Mangione MR, Giacomazza D, Bulone D, Martorana V, Cavallaro G, San Biagio PL. K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> effects on the gelation properties of κ-Carrageenan. *Biophys Chem* 2005;**113**:129-135.
- [15] Leathers TD. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotech* 2003;**62**:468-473.
- [16] Ueda S, Fujita K, Komatsu K. and Nakashima Z. Polysaccharide produced by the genus Pullularia I. Production of polysaccharide by growing cells. *Appl Microbiol* 1963;**11**:211–215.
- [17] Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polym* 2008;**73**:515-531.
- [18] Xiao Q, Lim LT, Tong Q. Properties of pullulan-based blend film as affected by alginate content and relative humidity. *Carbohydrate Polym* 2012;**87**:227-234.
- [19] Shih FF, Daigle KW, Champagne ET. Effect of rice wax on water vapour permeability and sorption properties of edible pullulan films. *Food Chem* 2011;**127**:118-121.
- [20] Lazaridou A, Biliaderis CG, Kontogiorgos V. Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polym* 2003;**52**:151-166.
- [21] Trinetta V, Cutter CN, Floros JD. Effects of ingredient composite on optical and mechanical properties of pullulan film for food-packaging applications. *LWT – Food Sci Technol* 2011;**44**:2296-2301.
- [22] Lebrun L, Blanco JF, Metayer M. Preparation of ion-exchange membranes using pullulan as polymer matrix. *Carbohydrate Polym* 2005;**61**:1-4.
- [23] Datta S, Mody K, Gopalsamy G, Jha B. Novel application of κ-carrageenan: As a gelling agent in microbiological media to study biodiversity of extreme alkaliphiles. *Carbohydrate Polym* 2011;**85**:465-468.
- [24] Tong Q, Xiao Q, Lim LT. Preparation and properties of pullulan–alginate–carboxymethyl cellulose blend films. *Food Res Int* 2008;**41**:1007-1014.

- [25] Jonsson G. Molecular weight cut-off for ultrafiltration membranes of varying pore size. *Des* 1985;**53**:3-10.

# 化学工学

創立75周年  
記念増刊号

Chemical  
Engineering  
of Japan

Vol. 75

No. **13**

2011



<http://www.scej.org/>

KKGKA4, 75(13)1-382(2011)



**OTHAMAN Rizafizah (マレーシア)**

1995年 東京工業大学工学部化学工学科 卒業

2009年 東京工業大学大学院理工学研究科国際開発工学専攻博士課程 修了

現在 Senior lecturer, School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia

日本と結んだのはもう18年近くです。学部に入学前に日本教育予備校に入り、日本を‘あいうえお’から漢字まで学んで、マレー語から英語、英語から日本語まで化学、物理と数学を必死に頭の中に保存していました。おかげで、東京工業大学の入試を合格しました。しかし、それでも他の日本人の学生と比べて知識のレベルが低かったです。先生の方言を分からなかったり、黒板の字を読めなかったり、冬が寒かったり、食べられる物は売っていなかったり。しかも、周りの友達より二、三倍以上勉強しなければいけなかったです。そのときつらかったなと思いました。しかし、時間が経てば経つほど、段々段々生活が面白くなってきました。それは、やっぱり周りの人のおかげでした。研究室のメンバー、周りのご近所さん、色んな機会に通じて出会った方々。その優しい心をもつ方々に感謝しています。みんなの励ましの言葉が自分の進むパワーになりました。最後の博士の勉強のときに、家族と来ていました。家は狭くて息苦しいですが家の外はみんなの守りで暖かかったです。この18年間日本とマレーシアの間を行ったりきたりして気づいたのは日本の技術が一流になったのは優れた会社や優れた大学のためではなく、その会社や大学を支えている社会があるからこそ、つまり一人ひとりの人間が日本という国を作ったのです。今でも、子供たちもよくまた日本に戻りたいなと言っています。



**ZOLJARGAL Jargalsaikhan (モンゴル)**

2010年 東京工業大学大学院理工学研究科国際開発工学専攻修士課程 修了

現在 Research Manager, Mongolyn Alt (MAK) Group

My Master course in International Development Engineering was with special focus on Chemical Engineering. I am thankful to my academic advisor and all of my friends, as well as for JICE for providing me JDS Scholarship for completion of the training program. It was right decision for me to study with focus on Chemical Engineering as my country strongly needs people with Process Engineering background. Now I work for development of Mineral Processing Projects and found the lessons learned in Japan are very useful. Japan always attracted me, by its people, by their unique culture and set of mind, stories about honest samurais, beautiful nature and so forth. I was seeking reasons of Japan's successes in technology progress and global business. After living and studying two years in Japan, I became marginally familiar with this country and loved this country. Country is always people. So I found the reason of Japan's success rather in its people, their culture and inherent approach for doing things perfectly than in effective management. I believe that knowledge I gained in Japan through my academic study in Tokyo Institute of Technology as well as through relationships with my friends will significantly contribute to my life and career.



**吳 鵬 (中国)**

2011年 日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻博士前期課程 修了

現在 日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻博士後期課程

2006年9月に来日し、日本語学校にて2年間日本語の修得に努め、2009年4月から、藤沢市にある日本大学大学院生物資源科学研究科(食品生命工学研究室：今井正直教授)に所属しています。食品由来の生体高分子を用いて鋭敏な分離特性を有する高分子膜の調製に成功し、学術誌 *Desalination and Water Treatment Vol.34* (2011) pp.239-245 に成果が掲載されました。博士後期課程では、膜内の物質拡散の機構を解明し、目的成分に最適化された affinity 高分子ネットワークの構造設計を目指します。大学院に入学して以来、化学工学・食品工学関係の学会(米沢(2009)、京都(2010、2011)、大阪(2011)、東京(2010、2011))、並びに国際会議(Xiamen, China(2009)、Sydney, Australia(2010)、Kyoto, Japan(2011))で発表の機会を頂き、受賞の機会(日本食品工学会(2010))にも恵まれました。先生方や日本で出会った友人と情報や知識を共有することにより、専門分野の学びを深めることが出来ました。将来は国際的な立場で膜科学、並びに食品や生命科学系の化学工学を通じて社会に貢献するとともに、留学によって得た個人レベルの信頼関係と文化的な背景を大切に人間的にも成長したいと思います。

# 平成24年度年報

## 第28卷

ANNUAL REPORT 2012 VOL.28

公益財団法人

飯島藤十郎記念食品科学振興財団

THE TOJURO IJIMA FOUNDATION  
FOR FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

### (3) 外国人留学生研究助成

#### 食品由来の構造多糖類における糖鎖ネットワーク制御 によるアフィニティー高度分離膜の開発

Development of food-derived structural polysaccharide  
affinity membrane involved in synergistic design of  
sugar chain

呉 鵬, 今井正直  
日本大学大学院生物資源科学研究科

#### 〔研究目的〕

近年、抗体医薬等に代表されるバイオ医薬品の分野では、タンパク質等の目的物質の発現技術が著しく進展している。それに伴い、クロマトグラフィー等による精製工程での生産性の向上が求められている。高度選択性を有する分離手段として、特定のタンパク質と特異的にかつ可逆的に吸着するリガンドを有する担体を用いて、タンパク質を分離精製するアフィニティークロマトグラフィーが注目されている<sup>1)</sup>。アガロースやセルロースなどの生体高分子由来のビーズを担体として用いたアフィニティークロマトグラフィーの場合は、目的タンパク質を含む被処理液をクロマトグラフィーにより処理する前に、被処理液から遠心分離またはフィルター濾過により細胞の破砕物等の懸濁物質を必要があるため、前処理工程が多く、目的タンパク質を含む被処理液が多量に必要とされる<sup>2,3)</sup>。

一方、生体高分子膜を担体として用いたアフィニティー分離の場合、目的タンパク質、不純物タンパク質及び細胞破砕物を含む被処理液を処理した時に、生体高分子膜のネットワークによる細胞の破砕物と目的タンパク質及び不純物タンパク質とを分離しながら、アフィニティーリガンドにより目的タンパク質と不純物蛋白質を一段プロセスでの分離精製が可能である<sup>4)</sup>。

本研究の目的は食品由来の構造多糖類としてカニやエビの殻の主成分であるキチンに注目し、これを脱アセチル化処理して得られるキトサンの糖鎖ネットワーク制御によって、リガンドとする Cibacron Blue F3GA を導入し、タンパク質に対する吸着機能を最大限に発見させることである。特に本研究の特徴としてシリカマイクロ粒子 (22~37  $\mu\text{m}$ ) を用いて膜表面改質することにより、水透過流速を大幅に増加させた。アフィニティークィトサン膜によって、タンパク質に対する高流速の高度な分離・回収を行い、食品並びに生体由来の未利用資源の高度利用とともに新しい高度選択性分離プロセスを提案する。

## 〔研究方法〕

### 1. キトサン膜の調製

分子量の異なる (low molecular weight, medium molecular weight と high molecular weight) キトサン粉末 1 g を 99 g, 1% (W/V) の酢酸水溶液に添加し, 完全に溶解されるまで 24 時間攪拌した。キトサン溶液の不溶物を除去するため吸引濾過した。その後 (濾紙 No.1 ADVANTEC, Tokyo), 予備実験の結果, 製膜後の膜の弾力性を増すために, glycerol (chitosan/glycerol 1 : 0.3) を添加し, 混合溶液が均一にさせるように, さらに 2 時間攪拌した。シリカゲル粒子 (22~37  $\mu\text{m}$ ) 1 g を混合溶液に添加し, 3 時間攪拌した後, キャスト液をガラスシャーレに 30 g 分注し, デイシケータで 24 時間保存した。(シリカゲル粒子を完全に沈降させるため)。330K を設定した熱風乾燥器で 12 時間乾燥したキャスト膜を 1.5M NaOH 水溶液で 12 時間中和し, 水洗後, さらに 1.5M NaOH, 343K で 5 時間湯煎してシリカゲル粒子を除去し, 純水中 (5 $^{\circ}\text{C}$ ) に保存して実験に供した。

### 2. Cibacron Blue F3GA の導入によるアフィニティーキトサン膜の新規調製

Cibacron Blue F3GA (CB) のトリアジン環にあるクロロ基とキトサンのアミノ基との求核置換反応によって共用結合し, アフィニティーキトサンを調製した。膜を 1 cm  $\times$  1 cm をカットし, 各濃度 (0.005~0.2mM) に調製された CB 溶液に入れ, 1 g NaCl を添加し温度を 333K に設定し 1 時間反応させた後, 1 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を添加し, さらに 2 時間反応させた。アフィニティーキトサンは 10mM pH6.9 のリン酸緩衝液を用いて, 洗浄溶液が CB の最大吸収波長 598nm では観察できなくなるまで洗浄した。その後, 洗浄液をメッサップし, 予め作った CB の検量線を用いて濃度を計算した。

### 3. 機械的強度の測定

調製した膜を幅 10mm  $\times$  長さ 40mm にカットし, 試験片とした。試験片の上部及び下部 10mm をレオメーター (CR-500DX, SUN SCIENTIFIC, Co. Ltd.) にて固定し, 牽引によって膜の機械的強度 (弾性) を測定した。

### 4. タンパク質による吸着

標準タンパク質としてウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin (BSA)) を用い, タンパク質吸着実験を行った。各濃度 (0.1~2 g/L) を調製された BSA 水溶液 100mL にアフィニティーキトサン (1 cm<sup>2</sup> 40枚) を入れ, 298K で吸着平衡に達するまで振盪させた。BSA 水溶液の平衡濃度は可視紫外分光光度計 (HITACHI, U-2900) にて 280nm の吸光度で測定した。吸着量  $Q$  は式(1)で表された。

$$Q = \frac{(C_0 - C_e) \times V_0}{m} \quad \dots (1)$$

ここで,  $Q$  は吸着量 [g/L] であり,  $C_0$  は最初の仕込み濃度 [g/L],  $C_e$  は吸着平衡に達した濃度 [g/L] である。 $V_0$  は最初の仕込み量 [L] であり,  $m$  は膜の質量 [g] である。

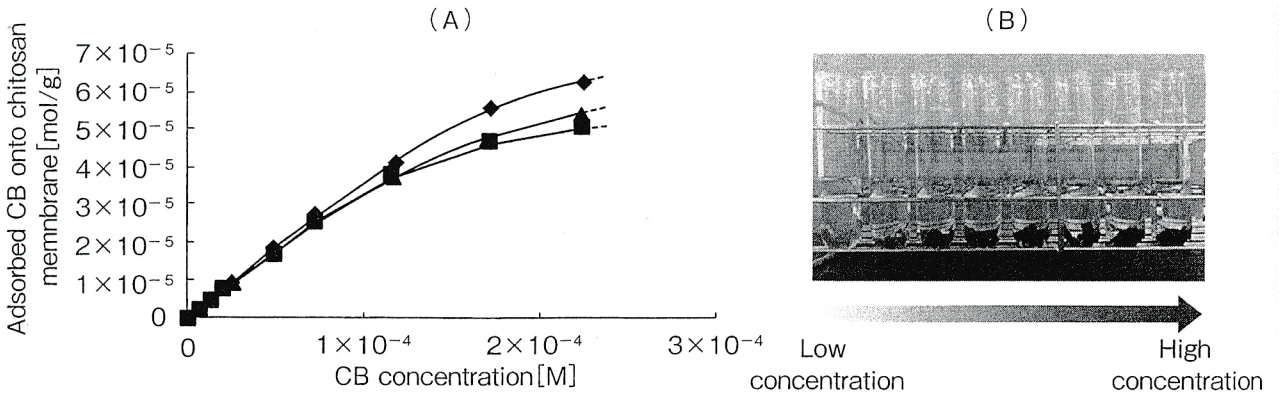


Fig.1 (A) Cibacron Blue F3GA adsorption on three types of chitosan membrane. (◆ : Low molecular weight ; ▲ : Medium molecular weight ; ■ : High molecular weight) ; (B) the photography of CB coupled chitosan membrane within different CB concentrations.

BSA の平衡吸着濃度  $C_e^{-1}$  と吸着量  $Q^{-1}$  をプロットした。Langmuir の吸着等温式 (式(2)) によって結果を整理した。

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_m K_L} \cdot \frac{1}{C_e} + \frac{1}{Q_m} \quad \dots (2)$$

$K_L$  [g/g] は吸着平衡定数であり,  $Q_m$  [g/g] は最大吸着量である。

### 5. 純水透過実験

膜を攪拌式限外透過装置にセットし, 透過セルに純水を190ml 充填した。セル内を攪拌しながら上部より窒素ガスにて加圧した。透過口を電子天秤内に設置したシャーレに接続し, 純水の透過質量を経時変化を求めた。操作圧力の測定は小型圧力変換器で行い, 計装用コンディショナーの表示値を読み取った<sup>5)</sup>。

#### [結果と考察]

##### 1. Cibacron Blue F3GA の導入によるアフィニティーキトサン膜の新規調製

Fig.1 (A) に, 298 K における三種類 (Low molecular weight, Medium molecular weight と High molecular weight) のキトサン膜に対する Cibacron Blue F3GA (CB) の吸着等温線を示す。吸着等温線において, low molecular weight キトサン膜は CB に対する平衡吸着濃度が medium molecular weight と high molecular weight キトサン膜より高い。高分子量のキトサンでは膜構造が過密となり, 吸着サイトが十分に活かされていない可能性を指摘することができる。Fig.1 (B) に, CB の濃度が高くなるに従って, キトサン膜が濃厚に染色されたことが観察された。

##### 2. 機械的強度の測定

異なるキトサン分子量と機械的強度の関係をキトサンの破断時の最大剪断応力と最大ひずみに注目して測定した。その結果を Fig.2 に示した。分子量の増加に伴い, 最大剪断応力と最大ひずみが増加した。分子量が大きくなることによって, 高分子鎖がより絡み合った状態



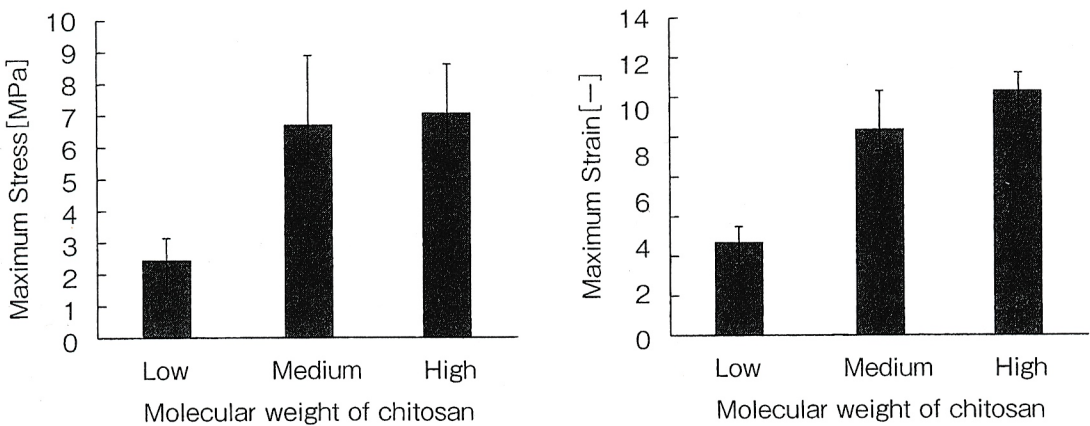


Fig.2 Effect of molecular weight on the maximum stress and the strain of prepared chitosan membrane.

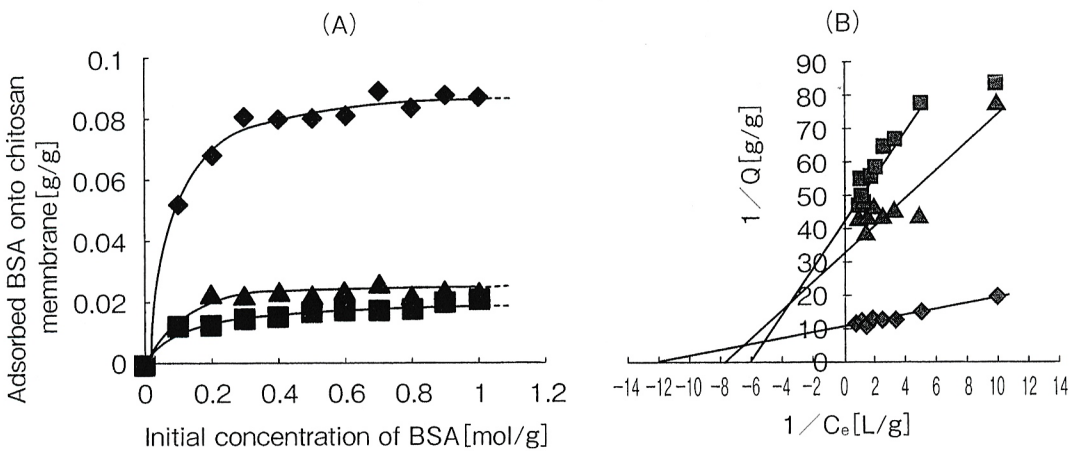


Fig.3 (A) : Effect of BSA adsorption onto the chitosan membranes over BSA concentration;  
 (B) : Linear representation of Langmuir equation of BSA with chitosan membrane.  
 (◆ : Low molecular weight ; ▲ : Medium molecular weight ; ■ : High molecular weight). membrane.

になり、弾性が増すとともに、破断時応力が増大し、より強固なネットワークが構築されたことが伺われる。

### 3. BSA の吸着

Fig.3 (A) は、pH6.9におけるアフィニティーキトサンに対する BSA の吸着等温線 (298 K) を示す。Low molecular weight キトサン膜において極めて大きい平衡吸着量を示した。最大吸着量  $Q_{max}$  は0.093 [g/g] であり、平衡吸着定数  $K_L$  は12.01 [g/g] であった。

Medium 並びに high molecular weight キトサンの  $Q_{max}$  は0.02 [g/g] 程度であり、low molecular weight の  $Q_{max}$  はその4.2倍以上に達している。これは BSA 分子による結果であるが、他の分子サイズによって  $Q_{max}$  の値が異なるのであれば、キトサンの吸着平衡に対する目的成分の分子サイズの影響として興味深い。

### 4. 純水透過実験

Fig.4 にキトサン膜を用いた水透過特性を示した。Fig.4 (A) はシリカゲル粒子で膜表面

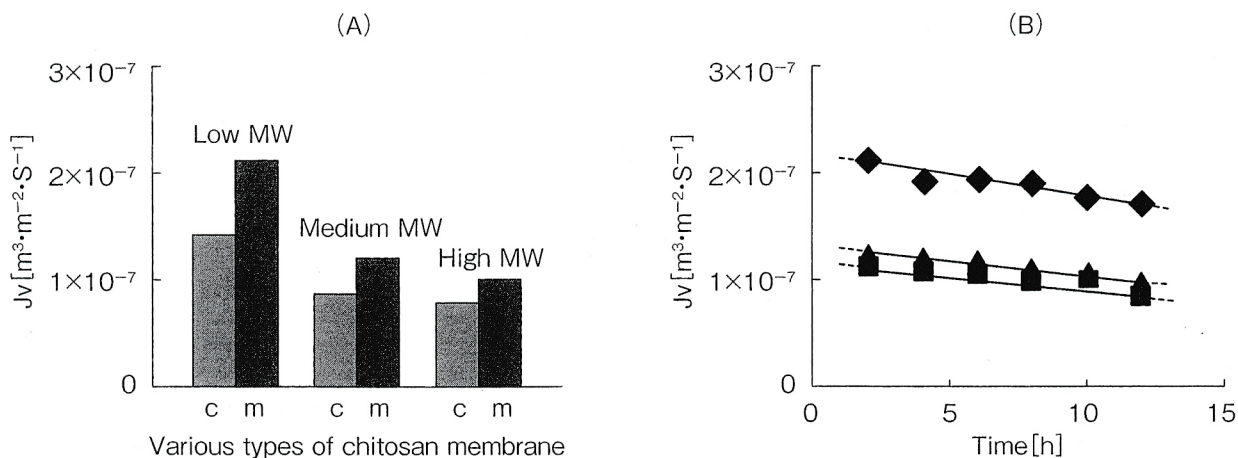


Fig. 4 (A) Comparisons of conventional (c) and surface modified (m) chitosan membrane on pure water permeability; (B) Effect of molecular weight on pure water permeability through chitosan membrane. (■ : Low molecular weight ; ▲ : Medium molecular weight ; ◆ : High molecular weight).

を処理されたキトサン膜と処理されないキトサン膜の水透過性能である。各分子量のキトサン膜において、シリカゲル粒子で処理された膜が明らかに高い水透過流束を示した。これは、シリカゲル粒子が製膜時に NaOH 水溶液中に溶け出し、膜面に凸凹が生じ、水との接触面積が実質的に増加したためと考えられる。Fig.4 (B) に水透過流束に対する操作時間の影響を示す。三種類のキトサン膜とも水透過速度は透過時間の経つに従って、やや減少する傾向が現れたが、この程度の低下はタンパク質の分離には大きな影響を与えることはないと判断できる。

[要 約]

本研究はキチンを脱アセチル化して得られるキトサンを用いて、アフィニティーリガンドとする Cibacron Blue F3GA を異なる分子量のキトサン膜に導入し、新規アフィニティー分離膜の調製に成功した。膜の機械的特性及びタンパク質吸着・分離、または水の透過性能をパラメーターとして検討した。機械的強度として分子量の高いキトサン膜ほど最大剪断応力と最大ひずみが最も大きい値を示し、弾性に富む強い膜の調製に成功した。タンパク質の例としてウシ血清アルブミンに対するキトサン膜の吸着能は low molecular weight キトサン膜が最も優れた吸着量を示した。純水透過実験の結果により、シリカゲル粒子により膜調製時に処理されたキトサン膜は高い純水透過性能を示したことから、本研究のキトサン膜はタンパク質に対する高度、高速分離の可能性を有すると期待できる。

引用文献

- 1) Kumar A., Galaev I.Y., Mattiasson B. : Polymer displacement/shielding in protein chromatography. *Journal of Chromatography B*, 741, 103~113, 2000.
- 2) Gustavsson P.E, Axelsson A., Larsson P.O. : Superporous agarose beads as a hydrophobic interaction chromatography support. *Journal of Chromatography A*, 830,

- 275~284, 1999.
- 3) Wang D.M, Hao G., Shi Q.H. : Fabrication and characterization of superporous cellulose bead fro high-speed protein chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1146**, 32~40, 2007.
  - 4) Zou H., Lou Q.Z., Zhou D.M. : Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **49**, 199~240, 2001.
  - 5) Takahashi T., Masanao I., Suzuki I. : Cellulose structure in an N-acetyl-chitosan membrane regulate water permeability. *Biochemical Engineering Journal* , **42** , 20 ~ 27, 2008.