家蚕フィブロイン膜における糖類の透過性

杉浦正昭, 新保外志夫

(工業技術院東京工業試験所第7部)

昭和49年7月5日受理

Permeability of *Bombyx mori* Fibroin Membrane to Some Sugars

By Masaaki SUGIURA and Toshio SHINBO

7th Division, National Chemical Laboratory for Industry, Hiratsuka

The permeation rates of glucose, sucrose and raffinose and that of potassium chloride in aqueous solutions through the fibroin membranes obtained from *Bombyx mori* cocoons were measured over the temperature range 5 to 90°C. From the plots of $\log K_m \cdot d/A$ vs. $1/T$ (K_m : apparent permeation constant, d : thickness of membrane, A : effective area of membrane, T : absolute temperature) for the sugars and the potassium chloride, two transition points were found at temperatures near 25 and 65°C for the fibroin membrane: these transition temperatures coincided with those obtained by dilatometric or viscoelastic measurements. The pores of the fibroin membrane through which the solutes can penetrate are narrower compared to those of cellulose membrane. The permeability of the fibroin membrane to a solute decreases rapidly with the increase in its molecular size. Measurements of pH dependence have revealed that the permeability to glucose becomes minimum in the vicinity of the isoelectric point of the membrane: in this case, the permeability is governed by the swelling of the membrane.

(Received July 5, 1974)

緒 言

前報⁽¹⁾では、家蚕繭中のフィブロイン繊維を臭化リチウム溶液に溶解し、これより得られる再生膜について、数種の中性塩による膜電位とそれらの透過速度の測定を行ない、イオンの透過性に及ぼす膜の電荷の影響について検討したが、本報告では、これとほぼ同じフィブロイン膜について、糖類（ブドウ糖、ショ糖、ラフィノース）の透過速度を温度を変えて（5~90°C）測定し、同じ条件での塩化カリウムの透過速度と比較しながら、糖類の透過性と膜の構造との関係を研究した。なお、この糖類の透過は、中垣らの解析法⁽²⁻⁴⁾によって検討した。

実 験

1. フィブロイン膜の調製 昭和48年春蚕繭（品種、太平×長安、生繭）を原料とし、先に述べた方法⁽¹⁾により、繭中のフィブロイン繊維を臭化リチウム溶液に溶解した。この溶液をセロハンチューブに入れ、室温（5

~20°C）で、約24時間の間、約40lのイオン交換水を流し、透析を行なった。それから、この溶液を遠心して（約10⁴×g, 10分間）、その上澄をアクリル樹脂板上に流し、扇風機による弱い風を与え、1~2日後、これより0.05~0.10mmの薄膜を得た。この膜に（樹脂板に付着したままで）20°Cの50%エチルアルコール水溶液および純エチルアルコールを順次加え、膜を各溶液にそれぞれ30分間浸漬するようにした。その後、膜を樹脂板よりはがし、室温で30分間真空乾燥し、デシケーター中に保存した。この膜は、測定前に一定の大きさに切断し、約30時間電解透析を行なった後、測定に用いた。なお本実験では、膜片を多数使用するため、上記のフィブロイン膜の調製におけるフィブロイン溶液の透析以後の操作は、前報⁽¹⁾の場合より簡略化したが、調製されたフィブロイン膜の塩化カリウムに対する透過能および膜の吸水量は、前報⁽¹⁾の膜の場合とほぼ同じ結果となり、その膜の構造は前報⁽¹⁾のそれとあまり変わらないと思われる。

2. 糖類および塩化カリウムの透過速度の測定 測定装置は前報⁽¹⁾と同じものを、つぎの点のみ改めて用いた。1) 40°C 以上の温度では、水の蒸発を防ぐために、各容器上部に覆を取付けた。2) 膜面半径を 1.5cm とし、膜を内部容器底にゴムパッキングで固定した。

最初、内部容器（濃厚溶液側容器）に 0.1 M の糖類または塩化カリウム溶液 20 ml を、外部容器（希薄溶液側容器）に水 400 ml を入れて、一定時間後、外部溶液の糖類または塩化カリウムの濃度をつぎのように検定し、透過速度の測定を行なった。すなわち、糖類の場合は、外部溶液を 2 ml 採取し、その濃度をフェノール-硫酸法⁽⁶⁾によって比色検定した。この場合、1つの濃度の測定を行なうと外部溶液の容量が 2 ml（全容量の 0.5%）減少するので、厳密には1回の測定ごとに新しく膜を変えて最初から測定しなければならない。しかし、実験結果（Fig. 1）に示すように、これによる透過定数の値はかなりばらつき、また比色法による濃度の測定誤差が 2% 含まれる⁽⁶⁾ことから、1つの濃度を測定した後、さらに一定時間後2度目の濃度の測定を行ない、その透過定数の値も測定値に含めて、測定値のばらつきの範囲を示した（Fig. 3）。一方、塩化カリウムの場合は、外部溶液濃度を電気伝導度の測定（横河ヒューレット製の万能ブリッジ 4255 A 型による）により、1枚の膜について連続的に検定した。

測定に用いた糖類（ブドウ糖、ショ糖、ラフィノース）および塩化カリウムの溶液は、市販の特級試薬を用いて調製した。なお、ブドウ糖については、25°C において pH を変えて測定したが、この場合の溶液の pH は酢酸塩緩衝溶液を添加して（緩衝溶液のイオン強度 1.0×10^{-3} M）調節した。このほかの測定では、溶液の pH の調節を行っていないが、それらの溶液の pH は約 5.6 である。

3. フィブロイン膜の温度-比容曲線 フィブロイン膜の構造を検討する資料として、フィブロイン膜の温度に対する比容の変化をディラトメーター法⁽⁶⁾によって測定した。ディラトメーターに封入した膜は、電解透析した膜で、約 6% の水分を収着したものである。

実験結果

1. 糖類および塩化カリウムの透過

単位面積当りの膜を透過する溶質の流れ（ J ）は、つぎの式⁽⁷⁾で表わされる。

$$JA = v_2 dc_2 / dt = K_m (c_1 - c_2) \quad (1)$$

ここで、 A は膜面積、 v_2 は外部（希薄側）溶液容量、 c_1 、 c_2 はそれぞれ内部（濃厚側）および外部溶液濃度、 t は時間、 K_m はみかけの透過定数である。膜に溶質の吸着がなく、内部と外部の溶液容量が変わらないと仮定すれば、

$$c_1 = c_1^0 - (v_2/v_1)c_2 \quad (2)$$

（ c_1^0 ：内部初濃度、 v_1 ：内部溶液容量）であるから、 K_m は t と c_2 の測定値から、つぎの式によって求められる。

$$K_m = \frac{v_2}{t} \int_0^{c_2} \frac{1}{c_{01} - (1 + v_2/v_1)c_2} dc_2 \quad (3)$$

$$= -\{v_2/t(1 + v_2/v_1)\} \ln \left[\{c_{01} - (1 + v_2/v_1)c_2\} / c_{01} \right] \quad (4)$$

そして各膜の透過能は、この K_m に膜の厚さ（ d ）と面積を考慮に入れた $K_m \cdot d/A$ の値によって評価される。

各糖類について求められた $K_m \cdot d/A$ の値の中で、各糖類とも2つの温度について、 c_2 と $K_m \cdot d/A$ の関係を Fig. 1 に例示する。これは1枚の膜において、最初に測定した濃度から算出した値である。各糖類とも、かなりのばらつきがみられ、 $K_m \cdot d/A$ の濃度依存性は明確に認められない。他の温度についても、これらとほぼ類似した傾向で、 $K_m \cdot d/A$ の値のばらつきの範囲は Fig. 3 に示す。

塩化カリウムの K_m の値は、(1)式において c_1, c_2 をそれぞれ $f_1 c_1, f_2 c_2$ (f_1, f_2 は活量係数) として、前報⁽¹⁾

Fig. 1. $K_m \cdot d/A$ vs. c_2 Plots for Sugars.

○ glucose (25°C), △ sucrose (25°C), □ raffinose (25°C), ● glucose (5°C), ▲ sucrose (70°C), ■ raffinose (50°C).

K_m : apparent permeation constant, d : thickness of membrane, A : effective area of membrane, c_2 : concentration of external (dilute) solution.

Fig. 2. $K_m \cdot d/A$ vs. c_2 Plots for KCl at Various Temperatures.

○ 5°C, △ 10°C, □ 15°C, ◇ 20°C, ⊙ 25°C,
● 30°C, ▣ 40°C, ● 50°C, ▲ 60°C, ■ 70°C,
◆ 80°C, ⊙ 90°C.

の方法により計算した。塩化カリウムの各温度における c_2 と $K_m \cdot d/A$ の関係を Fig. 2 に示す。この場合の $K_m \cdot d/A$ の値には、ばらつきがみられず、また高い温度 (70~80°C) を除いて c_2 の依存性は認められない。この中で、25°C における $K_m \cdot d/A$ の値は、前報⁽¹⁾の値とほぼ同じである。ただし、この場合は電導度計による測定のため、陽イオンと陰イオンの透過の差は検出できない。

Fig. 3. $\log K_m \cdot d/A$ vs. $1/T$ Plots for Sugars and KCl.

● glucose, ▲ sucrose, ■ raffinose, ○ KCl,
 T : temperature.

Fig. 4. Change in $K_m \cdot d/A$ with pH for Glucose at 25°C.

Fig. 3 には、各糖類と塩化カリウムの $\log K_m \cdot d/A$ と $1/T$ (T : 絶対温度) の関係を示す。これには糖類では、 $K_m \cdot d/A$ の平均値とそのばらつきの範囲を示し、塩化カリウムでは、 $c_2 = 5 \times 10^{-4}$ M における $K_m \cdot d/A$ の値を図示した。塩化カリウムでは、25°C と 65°C 付近に屈折点がみられ、糖類の場合も大体において、これと同様な傾向を示す。

25°C におけるブドウ糖の $K_m \cdot d/A$ の pH 変化を Fig. 4 に示す。フィブロイン膜の等電点 (pH 4.2⁽¹⁾) 付近において、 $K_m \cdot d/A$ の値は最低になる。

2. フィブロイン膜の温度-比容曲線

フィブロイン膜の温度-比容曲線を Fig. 5 に示す。この曲線には 25°C と 65°C 付近に屈折点がみられ、これは北村による⁽⁸⁾水分を収着した。アルコール未処理のフィブロイン膜の温度比容曲線にはほぼ一致する。

考 察

中垣⁽⁴⁾によれば、膜を低分子物が透過する場合、その $K_m \cdot d/A$ (P とする) の値は、つぎのように表わされる。

$$P \equiv K_m \cdot d/A = f b D^* \quad (5)$$

ここで、 f は主として膜の構造によって定まる膜定

Fig. 5. V_s vs. T Plot for Fibroin Membrane.

V_s : specific volume.

数, b は低分子物の膜外の濃度 (c, c_2) と膜の表面の細孔内の濃度 (c_1^*, c_2^*) との比で表わされる分配係数 ($b = c_1^*/c_1 = c_2^*/c_2$), D^* は細孔内の低分子物の拡散定数である. 膜が多数の細孔を有し, その細孔に満たされた溶媒の中を溶質が移行するときは, $f = \varepsilon/q^2$ (ε : 膜中における細孔の容積分率, q : 細孔の曲路率) となり, さらに溶質と膜との相互作用が小さいときは, b は1に近く, 自由溶液中の溶質の拡散定数 D_0 が D^* に近い値となる.

さて, 中垣ら^(3,8)は, セロハン膜におけるフェノキサゾン化合物の透過の研究において, 塩化カリウムでは, 膜との相互作用が小さいとみなし, その透過実験より得た P の値を用いて, (5) 式より, $b=1$, $D^*=D_0$ として f を求め, さらにこの f を用いて, 4 種類のフェノキサゾン化合物の P の値より, それぞれの D^* を算出し, D^*/D_0 の値から, これら化合物の透過における膜との相互作用を検討している. 本研究においても, これとはほぼ同じ考え方で, まず塩化カリウムの P, D_0 の値から f を計算した. その結果を Fig. 6 に示す. ここで各温度 ($T^\circ\text{C}$) の D_0 の値は, つぎの式⁽⁹⁾より算出した.

$$D_0 \times 10^5 = 1.595 \{1 + 0.0242(T-18) + 0.0001(T-18)^2\} \quad (6)$$

Fig. 6 の曲線では, 25°C および 65°C 付近に2つの屈折点がみられ, これは Fig. 3 の曲線の屈折点に対応するものである. 一般に, 高分子固体内に低分子が拡散する場合, その拡散のみかけの活性化エネルギーは, 高分子特有の転移温度 (ガラス転移等の) において変化するから, $\log D - 1/T$ (D : 拡散定数, T : 絶対温度) の曲線は, その温度において屈折する直線で表わされる. この D は (5) 式の fD^* に相当するから, Fig. 3 の曲

Fig. 6. f vs. T Plot for Fibroin Membrane.

f : membrane constant calculated from diffusion coefficient of KCl.

線の屈折点もフィブロイン膜特有の転移温度を示すものと思われる. この屈折点を示す温度は, また Fig. 5 に示すフィブロイン膜の温度-比容曲線の屈折点の温度に一致する.

フィブロイン膜の 25°C 付近の転移については, 吸水したフィブロイン繊維において, その弾性的性質がこの温度で急激に変化すること^(10,11), および吸湿量の大きいフィブロイン膜ほど温度-比容曲線の折曲りが大きいこと⁽⁸⁾から, 水が関与した転移と考えられる. このような転移は吸水したコラーゲンにおいても認められ⁽¹²⁾, また Fig. 3 の曲線の曲り方は, 水素結合をもつ高分子への低分子の拡散で⁽¹³⁾, その水素結合が破断されるとき $\log D \sim 1/T$ の曲線の変化に類似することから, フィブロインに結合した水分子相互の水素結合が, この温度において破断あるいは形成されると推測される. 一方, 65°C 付近の転移については, 温度-比容曲線では⁽⁸⁾かなり大きな変化が認められるが, フィブロイン繊維の動的粘弾性測定では, その転移が認められる場合^(11,14)と認められない場合⁽¹⁵⁾があり, どのような転移であるかは明確ではない. しかし, この温度付近より高い温度において膜の透過能が著しく増すことは, フィブロイン

Fig. 7. $\log D^*$ ($\log D_0$) vs. $1/T$ Plots for Sugars and KCl.

● glucose (D^*), ▲ sucrose (D^*), ■ raffinose (D^*), ○ glucose (D_0)^a, △ sucrose (D_0)^b, ▣ raffinose (D_0)^c, ▤ raffinose (D_0)^d, ○ KCl (D_0)^a.

D^* : diffusion coefficient in pores of membrane, D_0 : free diffusion coefficient. The values of D_0 were obtained from the following literatures; ^a) Reference 16, ^b) Reference 17, ^c) Reference 18, ^d) Reference 9.

分子のセグメント運動が、この温度より激しくなるに相違ないと思われる。

つぎに、塩化カリウムによって求めた f の値を用い、各糖類の D^* の値を計算すると (この場合も $b=1$ とし)、Fig. 7 に示す結果が得られる。また、この図には、文献^(9,16-18)による各糖類の D_0 の値を併記した。

Fig. 7 に示された各糖類の D^* の値は、塩化カリウムの透過できる細孔を基準としたときの細孔内の平均の拡散定数であるから、塩化カリウムが透過できる細孔の中には糖類の透過できない細孔もあり、それゆえに、本研究における糖類の D^*/D_0 の値は、糖類と膜との相互作用よりも、むしろ分子の大きさの影響を示すものと考えられる。この点について、さらに 25°C において、フィブロイン膜と同じ条件で測定したセロハン膜 (Visking 社、透析用セロハン膜) の値と比較してみる。Table I にフィブロイン膜とセロハン膜における塩化カリウムの P と、これより算出した f の値、および各糖類の $P, D^*, D_0, D^*/D_0$ の値と、 D^* の値のフィブロイン膜のセロハン膜に対する比率 (F/C) を示す。ただし、塩化カリウムの P の値は、ここでは $K_m \cdot d/A$ の代りに、膜の電荷の影響を排除した $K_0 \cdot d/A$ の値 (K_0 は真の透過定数で、前報^(1,19)の膜電位測定値より、前報で述べた方法により計算した) を用いた。Table I から、 F/C の値は、糖類の分子が大きくなるほど小さくなるが、これはフィブロイン膜では、セロハン膜と比較して、溶質の透過できる細孔が狭く、溶質分子が大きくなるほど、その透過能が

Table II. Values of P and f for KCl, and D^* and D^*/D_0 for Glucose at Various pH's

pH	$P^{1)}$ (cm^2/sec)	$f^{2)}$	D^* (cm^2/sec)	$D^*/D_0^{2)}$
3.7	4.5×10^{-7}	0.024	2.6×10^{-6}	0.39
4.3	4.0×10^{-7}	0.021	1.9×10^{-6}	0.28
4.6	4.2×10^{-7}	0.022	2.0×10^{-6}	0.30
4.9	4.2×10^{-7}	0.022	2.3×10^{-6}	0.34
5.2	4.3×10^{-7}	0.023	2.3×10^{-6}	0.34
5.7	4.4×10^{-7}	0.024	2.3×10^{-6}	0.34

¹⁾ $P=K_0 \cdot d/A$. ²⁾ in all cases, 1.87×10^{-5} and $6.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$ are used as values of D_0 for KCl and glucose respectively.

急速に低下することを示すものと思われる。

pH を変えた場合のフィブロイン膜における塩化カリウムの P ($K_0 \cdot d/A$ による) と、これより算出した f の値、およびブドウ糖の $P, D^*, D^*/D_0$ の値を Table II に示す。ただし、塩化カリウムおよびブドウ糖の D_0 は pH によって変らないと仮定して計算した。Table II では、いずれの値も pH 4.3 を最低値として、これより遠ざかる pH ほど、それらの値は高くなる。これは等電点付近では、膜の膨潤度が最も小さく、等電点を離れた pH ほど膜は膨潤し、膜の細孔もそれに応じて拡大することによると考えられる。

要 約

家蚕繭より得たフィブロイン膜について、糖類 (ブドウ糖, ショ糖, ラフィノース) および塩化カリウムの透過速度を広い温度範囲 (5~90°C) にわたって測定し、得られた結果から、糖類の透過性と膜の構造との関係を検討した。

糖類と塩化カリウムの透過速度の測定より得られた $\log K_m \cdot d/A \sim 1/T$ の曲線から、25°C と 65°C 付近に、フィブロイン膜の2つの転移点が見出される。これらは、比容や粘弾性の測定から得られる転移温度と一致する。フィブロイン膜の溶質が透過する細孔は、セロハン膜のそれより狭く、そのためフィブロイン膜では分子が大きくなると急激にその透過性を減少する。ブドウ糖の透過における pH 依存の測定では、フ

Table I. Comparison between Fibroin and Cellulose Membranes at 25°C

a) Values of P, D_0 and f for KCl

Membrane	$P^{1)}$ (cm^2/sec)	D_0 (cm^2/sec)	f
Fibroin	4.0×10^{-7}	1.87×10^{-5}	0.021
Cellulose	1.55×10^{-6}		0.083

¹⁾ in this case, $P=K_0 \cdot d/A$ (K_0 : standard permeation constant), calculated from $K_m \cdot d/A$ and membrane potentials.^(1,19)

b) Values of $P, D^*, D_0, D^*/D_0$ and F/C for Sugars

Sugar	Membrane	P (cm^2/sec)	D^* (cm^2/sec)	D_0 (cm^2/sec)	D^*/D_0	$F/C^{1)}$
Glucose	fibroin	5.2×10^{-8}	2.5×10^{-6}	6.7×10^{-6}	0.37	0.74
	cellulose	2.8×10^{-7}	3.4×10^{-6}		0.51	1
Sucrose	fibroin	2.6×10^{-8}	1.2×10^{-6}	5.2×10^{-6}	0.23	0.63
	cellulose	1.6×10^{-7}	1.9×10^{-6}		0.37	1
Raffinose	fibroin	1.3×10^{-8}	6.2×10^{-7}	4.4×10^{-6}	0.14	0.48
	cellulose	1.1×10^{-7}	1.3×10^{-6}		0.30	1

¹⁾ ratio of D^* for fibroin to that for cellulose.

ブロイン膜の等電点付近において、その透過性は最小となる。これは、膜の膨潤性によるものである。

終りに藪試料を賜り、フィブロインについて有益なご助言をいただいた東京農工大学、北村愛夫博士に感謝の意を表す。

- (1) 杉浦正昭：農化，**47**，563 (1973).
- (2) 中垣正幸，古賀直文，岩田修造：薬誌，**82**，1134 (1962).
- (3) 中垣正幸，古賀直文，岩田修造：同上，**82**，1138 (1962).
- (4) 中垣正幸編：続・生体膜と膜透過，南江堂，1974，p. 1.
- (5) 日本化学会編：実験化学講座，第23巻，生物化学I，丸善，1957，p. 421.
- (6) 日本化学会編：実験化学講座，第8巻，高分子化学下，丸善，1957，p. 88.
- (7) 小嶋陽之助，永沢 満：日化，**72**，378 (1951).
- (8) 北村愛夫：日蚕雑，**36**，113 (1967).
- (9) H. R. Bruins： *International Critical Table*，**5**，63 (1929).
- (10) 飯塚英策：製糸絹研究発表抄録，**11**，99 (1961).
- (11) E. Iizuka： *Rep. Progr. Polym. Phys. Japan*，**5**，165 (1962).
- (12) J. C. W. Chien and E. P. Chang： *Biopolymers*，**11**，2015 (1972).
- (13) K. Kanamaru and M. Sugiura： *Kolloid-Z.*，**178**，1 (1961)； *idem: ibid.*，**194**，110 (1964).
- (14) 藤野清久，河合弘迪：製糸研究報告書，日本製糸協会，1950，p. 190.
- (15) 馬越 淳：材料，**22**，499 (1973).
- (16) J. K. Gladden and M. Dole： *J. Am. Chem. Soc.*，**75**，3900 (1953).
- (17) P. N. Henrion： *Trans. Faraday Soc.*，**60**，72 (1964).
- (18) P. J. Dunlop： *J. Phys. Chem.*，**60**，1464 (1956).
- (19) M. Sugiura, M. Kikkawa and T. Shinbo： *Proc. Japan Cong. Mat. Res.*，**17**，177 (1974).