

# 絹糸の加水分解におけるチロシン収量と時間の関係について

今井 甲子男・西川 悌雄

Kashio IMAI and Yasuo NISHIKAWA : The Relation between the Yield of Tyrosine and the Time of the Hydrolysis of Silk.

(1957年9月20日受理)

## 緒言

チロシンは水に難溶性であるために、他のアミノ酸より遙かに製取し易く、ことに絹フィブロイン中には約10%を含有するといわれているため、これを製するには絹屑を材料として硫酸または塩酸にて加水分解する方法が広く行われている。この方法は<sup>1)</sup>BOPP, E. FISCHER, E. ABDERHALDEN<sup>2)</sup>以後一般的方法として採用されていることは周知の事実である。しかし本法による実施者によつてはその分解処理の如何によつて収量に差異のあるのみならず場合によりついに失敗に終つた者もあると聞くので(チロシンは酸によりレゾルシン様の物質に変化するとの説もあるがその真疑は不明である)著者らはその原因を明らかにしようとして本研究を行つた。

本研究においては主として加水分解時間の影響を検し、その手段として次の三種の実験を行つた。

1) ABDERHALDEN<sup>2)</sup>の方法にしたがい絹屑を塩酸にて加水分解し、分解後、苛性曹達にて pH 6 に中和し、析出する粗製チロシンを再結し、すべての操作は出来るだけ同様にして加水分解時間 4~32 時間による収量の差を検する。

2) 純チロシンを(1)と同様の条件にて時間を異にし、加水分解し残存するチロシンの量をそのまま光電比色計にて比色定量しその差を検する。

3) 純チロシンまたは絹屑を(1)と同様の条件にて時間を異にして加水分解した後、濾紙電気泳動法により残存し、または生成するチロシンのみを分離し、(2)と同様の比色定量により定量しその多少を検する。

## 実験の部

1) 絹屑の加水分解時間とチロシン収量との関係

a) 加水分解法

絹糸屑より夾雑物を除き、熱水にて洗滌したものを試料とし、その 100g に 30% 塩酸 300cc を加えて 1 夜浸漬して繊維を分散せしめた後、逆流冷却器を附して種々の時間、砂皿上にて軽く煮沸し、次に減圧下にて濃縮する。この濃縮は水を加えて 3 回繰返し出来る限り塩酸を除去した後、水を加えて 300cc となし、5g の活性炭を加えて 10 分間煮沸、湯煎鍋中にて加熱脱色し濾過する。濾液に 3 規定苛性曹達を加えて pH 6 に中和し水冷放置して析出する結晶を濾集し、得られる粗結晶を精製するため 3 規定塩酸 30cc に溶解し水 20cc にて稀釈し、また 5g の活性炭を加えて湯煎鍋上にて 10 分間加熱、濾過し、濾液は 3 規定苛性曹達にて中和し水冷放置して析出する結晶を集めさらに熱水より再結晶する。濾液は濃縮しさらに得られる粗結晶を熱水より再結晶し純品となし前者に加える。かくして得られる製品は分解点 314°C で純チロシンに一致する。

b) 加水分解時間によるチロシン収量の比較

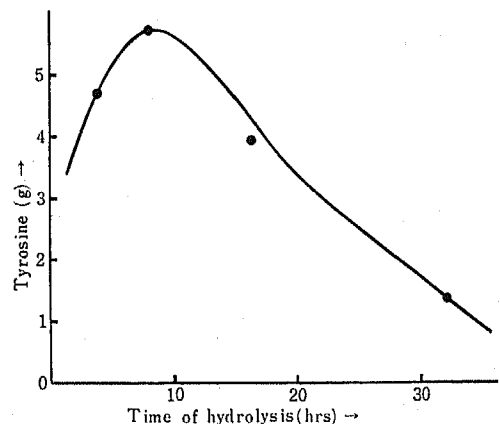


Fig. 1 Relation curve of hydrolysis time and tyrosine yield

加水分解時間を4, 8, 16, 32時間とし, その他の条件は(a)と同様にして実験を行い, 純製品の収量を検し, それぞれ4.7, 5.7, 3.8, 1.4g等の結果を得た。時間の短きは加水分解不十分なるも, 長きは却つて収量悪く約8時間の加水分解が適当である結果を得た。これを図示すれば Fig.1 の如くである。

## 2) 純チロシンの塩酸処理後のミロン反応のみによるチロシン量の比較

チロシンの収量は絹屑の加水分解時間が長い時は却つて減少することが(1)にて認められたので純チロシンを前回同様な加水分解的処理を行い, その塩酸分解液につき一般法に従い, ミロン反応の強弱を比色し 1)b)のごときチロシン収量の減少がチロシンの反応であるミロン反応の強度に表われるか否かを検した。本比色試験法はチロシンの比色定量法に従い光電比色計により測定した。ただし測定時間およびフィルターは次の理由で発色後15~30分, Blue (470m $\mu$ )を用いた。測定温度は24°Cであった。

i. フィルター選定: 純チロシン標準溶液についてベックマン式分光光度計にて吸収曲線を求め Fig.2 を得た。従つて, フィルターは 470m $\mu$  を採用した。

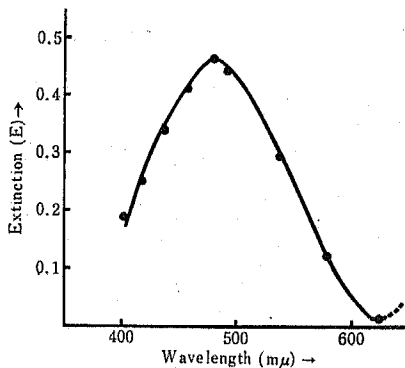


Fig.2 Absorption spectra of tyrosine

ii. 測定時間: 各種濃度のチロシン標準液につきミロン発色後 (NaNO<sub>2</sub>を加えた時間を t=0 とする) の時間と吸光度との関係を検し Fig.3 を得たので 15~30 分の間では吸光度がほぼ一定していることを認めた。

各実験に用いたチロシン量はそれぞれ 200 $\gamma$  を使用し種々なる時間塩酸にて前法のごとく処理し各時間処理後のチロシン残量を比色定量した。その結果は Fig.4 のご

とくであり, 塩酸処理時間による影響は全く認められなかった。

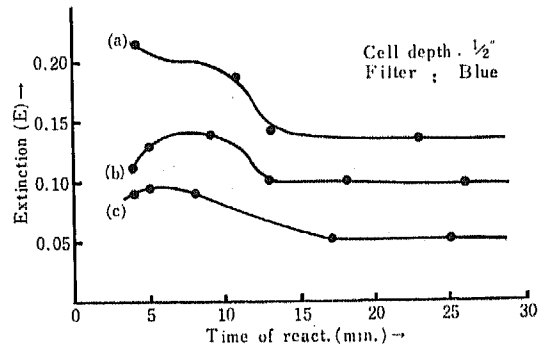


Fig.3 Relation curve of extinction and reaction (3 experiments a, b, c)

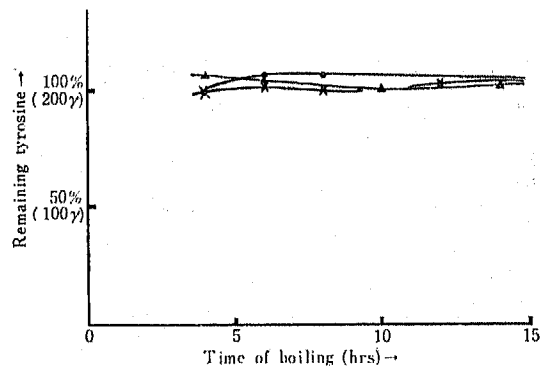


Fig.4 Direct analysis of boiling tyrosine with HCl (3 experiments)

## 3) 時間を異にする加水分解物の濾紙電気泳動法によるチロシン分離定量の比較

実験(1)においてはチロシンの収量は絹屑の加水分解時間により差を生じ, 実験(2)においては純チロシンが加水分解と同様な塩酸処理により何ら時間により差を認めなかった。これはチロシンが塩酸と長く熱せられる時その一部がチロシンとは別のフェノール性物質に変化すると考えられるので, 単にミロン反応のみでは両者の区別がないためと考えられる。それ故本項においては濾紙電気泳動法を利用して加水分解物よりチロシンのみを分離し, しかる後光電比色計により比色定量することとした。

### a) 絹屑の塩酸加水分解の場合

実験(1)の場合と同じ試料 8g に 30% 塩酸 24cc を加

え逆流冷却器を附して温度 120~125°C の油浴中にて軽く煮沸して、各経過時間ごとに、すなわち、4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20時間目に 3cc 宛分取し濾過し、濾液 2cc を採り常圧にて蒸発する。これに 2% 塩酸を加えて 10cc となしチロシン定量の試料とする。この試料 0.02 cc を採り DURRUM の方法に従つて濾紙電気泳動法を行つた。なお装置は TISELIUS の方法に従つた。泳動条件は次のごとくである。

Filter paper : Tōyō filter paper No. 51, 5×36cm  
Buffer solution : K-Bipthalate-NaOH pH 5.9  
Migration current : 0.9mA/cm, 420V→250V  
Apex height : 16.5cm  
Time : 2 hr  
t°C : 26

泳動を終つた濾紙は 60~80°C の空気乾燥器中にて乾燥し、一方の側を 5mm 巾に切り取りニンヒドリンを用いて定性的にチロシン・ゾーンを見出し、もとの濾紙は中林または木藤の方法に従い 2% 塩酸にて吸収されているチロシンを抽出した。抽出は約 20 時間で 6~10cc になるようにした。かくして得たチロシン・ゾーンの抽出液を湯煎鍋上にて蒸発し、2% 塩酸 1cc に溶解して定量の試料としミロン反応を用いて呈色せしめ光電比色計にて前記(2)に示した条件により比色定量を行い次に図示する Fig. 5 のごとき結果を得た。

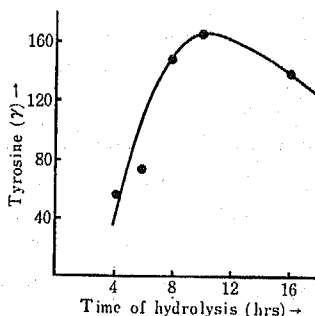


Fig. 5 Relation between the time of hydrolysis of silk with HCl and the amount of tyrosine yield (by indirect method)

なお上記実験の試験として電気泳動および比色定量を行う前に一定量のチロシンを既知物質および蛋白質分解物(チロシンを含まず)とそれぞれ混合し予備実験を行つたところ添加物の影響なき満足すべき結果を得た。

b) 純チロシンの塩酸による加熱処理の場合

純チロシン 0.101g を 30% 塩酸 10cc 中に溶解し(a)の場合と同様に処理し、処理液中に残存するチロシンを濾紙電気泳動法により分離、抽出しミロン反応により前記同様に比色定量した。

泳動条件は次のごとくである。

Filter paper : Tōyō filter paper No. 51, 5×29cm  
Buffer solution : 5N-AcOH pH 1.7

	Exp. I	Exp. II
Migration current :	1.2mA/5cm	1.2mA/5cm
	480V→250V	460V→230V
Apex height :	12.5cm	12.5cm
Time :	2 hr	2 hr
t°C :	30	27

定量結果は Fig. 6 のごとくである。

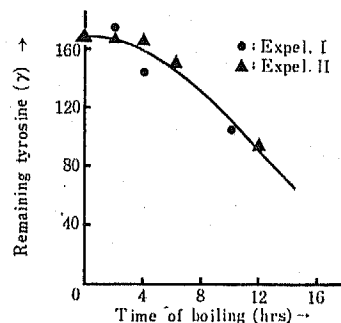


Fig. 6 Relation between the time of treatment with HCl and the remaining tyrosine (by indirect method)

この場合にもチロシン、フェノール、アラニンなどの混合物につき濾紙電気泳動および比色定量につき予備実験を行つてから施行した。

以上の結果から明らかなように絹屑のごときチロシン含有物の酸加水分解物中のチロシンは直接ミロン反応による比色定量は不適当で電気泳動法のごとき適切な方法でチロシンを分離した後、ミロン反応により比色定量する必要のあることを認めた。

## 結 論

本実験の結果を見るにチロシンは熱塩酸と長く共存せしめる時はその一部はフェノール性物質に変化すると考えられ、そのため絹屑はもとより一般蛋白質においてもその加水分解物中のチロシン含量はチロシンの分解によ

り生ずると考えられるフェノール性物質の存在のため単にミロン反応のみによる比色定量には不適当であり、かかる試料中のチロシンの定量は一応チロシンのみを適当な方法で分離して比色定量にかけなければならないことを認め、その方法として瀘紙電気泳動法を利用することが便利であることを認めた。

これにより絹屑の加水分解によりチロシンを取得しようとする時は加水分解時間を適当にして、一旦生成したチロシンが甚だしくフェノール性物質に変化しない時間以内に加水分解を中止しなければチロシンは好収量にて取得することは出来ないことを知った。すなわち絹屑よりチロシン製造を目的とする際は常法のごとく 30% 塩酸を試料の約 3 倍量加え加水分解を行うとすれば分解時間は 8~10 時間で止めるのが最も適当であることを認めた。

なおチロシン含有物の酸加水分解中チロシンが糖類等の存在でメラニン物質に変化してその収量を減ずることはよく知られているが、またチロシンがフェノール性水酸基を有する物質である以上、加水分解中酸素のために酸化されその収量を減ずる可能性のあることも考えられる。

この研究に当り御懇切なる御教導を賜った恩師大平敏彦教授に深甚なる謝意を表します。

(本研究に就ては昭和32年10月19日本学部における日本農芸化学会中部支部第15回研究発表会において発表)

## 文 献

- 1) F. BOPP : Ann., 69, 16 (1861)
- 2) E. ABDERHALDEN : Z. physiol. Chem., 48, 528 (1906)
- 3) O. FOLIN, V. CIOCALTEU : J. Biol. Chem., 73, 627 (1927)
- 4) E. L. DURRUM : J. A. C. S., 72, 2943 (1950)
- 5) A. TISELIUS : Adv. Prot. Chem., 8, 461 (1952)
- 6) 中林敏郎 : 農化, 27, 272 (1953)
- 7) 木藤半平 : 信大科学教育研報, 2, 3 (1953)

## Summary

The authors recognized first in these experiments that the longer the time of hydrolysis of waste silk the less yield of tyrosine as its hydrolysis products is obtained, and then the most suitable time of this hydrolysis for the best yield of tyrosine is 8 to 10 hours when 30% HCl 3 times as much as the weight of the waste silk is used.

In the next experiments by electrophotometry and paper-electrochromatography, the authors obtained the following results : 1) When tyrosine is analysed by the method of electro-photometry directly after hydrolysis, there is no difference in the amount of tyrosine in the hydrolysates of waste silk. 2) When the tyrosine formed are separated by the method of paper-electrochromatography and analysed as above, there is diminution in the amount of tyrosine in the same hydrolysates, and the same results are also obtained in the case of pure tyrosine.

These facts seem to be due to phenols which are formed as the by-products of hydrolysis from tyrosine and to their reactions with Millon's reagent as in the case of tyrosine.

From these experimental results, the authors came to the following conclusion : If tyrosine in hydrolysate of protein is to be analysed correctly, it must be analysed after separation of phenolic by-products except tyrosine, and if the best yield of tyrosine from protein such as waste silk is wanted, the time for hydrolysis should not be longer than the suitable hours described in the beginning of this summary.