

過マンガン酸加里による絹フィブロインの酸化生成物に関する研究

阿久根 了・古賀 克也・福永 隆生

Studies on Oxidative Products of Silk Fibroin treated with Potassium Permanganate

Satoru AKUNE, Katsuya KOGA and Takao FUKUNAGA

(Laboratory of Sericultural Chemistry)

I 緒 言

絹フィブロインの酸化については GOLDSCHMIDT⁽¹⁾を初めとして中島⁽²⁾, 奥⁽³⁾⁽⁴⁾, 赤堀⁽⁵⁾, 村瀬⁽⁶⁾らの数多くの研究がある。著者らは既報⁽⁷⁾⁽⁸⁾のごとく過マンガン酸カリによる絹フィブロインの酸化について研究を行い酸化機構に対する若干の知見を得た。この酸化過程について追究を行うために CO₂, NO₂ の定量, アミノ態窒素及び tyrosine の消長を調べ, さらに酸化中間生成物に対する分離精製法について検討を行い, イオン交換樹脂 (Amberite IR-120) を使用して純度の高い 4 個のフラクションを分離することができた。得られた各フラクションについて 2, 3 の物理化学的性質の検討を行つたのでそれらの結果について報告する。

II 実験結果並びに考察

(1) 酸化の最終生産物並びに酸化過程におけるアミノ態窒素及び tyrosine の消長

(i) CO₂ 及び NO₂-N の定量

絹フィブロインは KMnO₄ 溶液で処理すれば速かに酸化分解して黒変する。著者らはこの酸化過程において定性的に CO₂, NO₂ の生成を確認したので両者の定量を行つた。

CO₂ の発生量は極めて多量であるから加里球を用いる重量法⁽⁹⁾で定量した。併せて行う NO₂-N の定量には GRIESS ROMIJIN reagent 0.3 gm を水 50 cc に溶かした液に発生ガスを導入し反応させた後さらに 20 分間放置して発色を完全ならしめデュボスク比色計で比色する方法⁽¹⁰⁾を用いた。

試料(精練絹) 50 mg を 1 N-H₂SO₄ 酸性下で過剰の 1 N-KMnO₄ 液と電気湯煎器中 70°C で反応させ発生するガスについて上記定量法を組合わせて同時に測定を行つた。その結果は第 1 表の通りである。

Table 1. Amounts of CO₂ and NO₂-N produced by treating fibroin with 1N-KMnO₄ in acidic in the different times

gas \ time (hr)	0.5	1	2	3	Fibroin taken 50mg
CO ₂ (mg)	20	36	52	66	
NO ₂ -N (γ)	16	31	36	44	

この結果は 3 時間迄のものであるがガス発生量は反応時間と共に増大することがみられる。なお、ガス発生量は最初の半時間迄は相対的に多くその後時間経過と共に遞減することは両者何れにおいても類似している。かかる傾向は阿久根⁽¹¹⁾が絹フィブロインの KMnO₄ 消費量について報告したものと同様である。短時間における CO₂ の発生量が非常に多いことは著者らの酸化機構に対する推定⁽⁸⁾と照合すると興味あるものである。絹の酸化過程における CO₂ の定量は中島⁽²⁾が既に行つてい

るが NO_2 については未だその報告をみない。著者らは上記のごとく酸化の最終生産物として CO_2 及び $\text{NO}_2\text{-N}$ の生成量を同時に定量的に測定し得ることを確認した。かかる方面から詳細なる検討を行うことも酸化機構に対する一つの解明方策であると考えられる。

(ii) アミノ態窒素及び tyrosine の消長

常法により精練した練絹 500 mg 宛をとり水 20 cc を加え第2表に示すごとくそれぞれ異なる量の KMnO_4 を加えて酸化を行つた。この場合酸化の終了迄の時間はそれぞれ異なるので時々攪拌して KMnO_4 の紫色が消失するまで放置した。その後これを濾液と残渣とに分けた。両者はそれぞれ 20% NaOH で充分加水分解を行いそれについてアミノ態窒素は VAN SLYKE 法により tyrosine は FOLIN 法⁽¹²⁾により定量した。その結果は第2表の通りである。

Table 2. Variation of amino-N and tyrosine contents when silk was treated with different amounts of KMnO_4

KMnO_4		Amino-N in Silk D.M. 1gm	Amino-N index	Tyrosine
0 (mg)	Silk	176.1 (mg)	100	10.98 (%)
100	Filtrate	6.1	3.5	0
	Residue	151.5	86.0	4.45
	Total	157.6	89.5	4.45
200	Filtrate	15.1	8.6	0
	Residue	148.4	84.3	0.62
	Total	163.5	92.9	0.62
300	Filtrate	21.2	12.0	trace
	Residue	121.2	68.8	0.27
	Total	142.4	80.8	0.27
400	Filtrate	33.3	18.9	trace
	Residue	108.2	61.4	//
	Total	141.5	80.3	—
500	Filtrate	54.5	30.9	trace
	Residue	84.8	48.2	0
	Total	139.3	79.1	—
1,000	Filtrate	8.5	4.8	trace
	Residue	9.0	5.1	0
	Total	17.5	9.9	—
1,500	Filtrate	6.7	3.8	trace
	Residue	0	0	0
	Total	6.7	3.8	—

D. M. . . . dry matter

この結果から KMnO_4 の量に応じて絹フィブロインは酸化分解を受けて水に可溶の低分子となると共にアミノ態窒素も減少することがみられる。酸化崩壊物を含む濾液中にアミノ態窒素が最も多いのは原絹フィブロイン中の約 1/3 に相当する量が溶出した場合である。

すなわちそれは絹と同量の 500 mg の KMnO_4 を加えた場合で KMnO_4 の量がそれより増加すると共に濾液中のアミノ態窒素及び総アミノ態窒素は何れも著しく減少することがみられる。かかる事実からも残存する KMnO_4 は溶解された崩壊物の酸化にもあずかることが判る。

それゆえ、溶出した酸化崩壊物の捕収を目的とする場合には KMnO_4 を数回に分けて酸化を行い可及的に濾液と残渣を繰返し分別することが適当と考えられる。

KMnO_4 を少量使用したものでは残渣中には tyrosine の存在が認められるがその際アミノ態窒素の減少に比較すれば tyrosine の減少は著しい。

KMnO_4 用量 400 mg 以上のものでは tyrosine は完全に消滅している。然るにアミノ態窒素はの場合未だ 80% が存在している。

tyrosine は濾液中には何れの場合も皆無か根痕程度である。これらの結果は既報⁽⁷⁾⁽⁸⁾の裏書きともなるものである。

(2) 酸化生成物のフラクション分離

(i) 分離方法

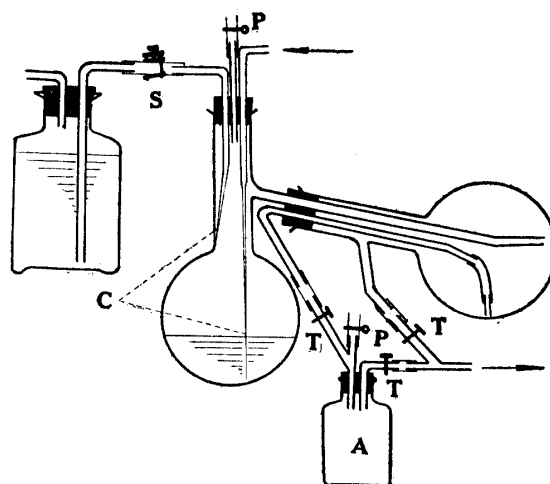
著者の 1 人阿久根⁽⁷⁾が先に行つた方法をさらに改良して下記のごとく分離を行つた。

試料としては副蚕糸(生皮芋)を常法により精練し充分水洗後風乾したものをを用いた。

KMnO_4 10 gm を水 600 cc に溶かしこれに試料 50 gm を浸漬して時々攪拌した。 KMnO_4 の紫色が褪色した後ブフナー濾斗で繊維の部分のみを分離し残渣は前回と同量の KMnO_4 溶液で酸化を行つた。この操作を 5 回繰返し全部の濾液をさらに濾紙パルプで濾別して透明な淡黄色の液を得た。この液の pH は 7.2 であつた。得られた酸化濾液中には多量の K , Mn イオンが存在するのでこの除去にカチオン交換樹脂 (Amberlite IR-120) を用いた。この樹脂処理の際 pH の変化、吸着等のために多少の沈澱が樹脂層内に集積してくる。これを逆洗によつて流出させこの洗液より沈澱を濾取して Part I とした。樹脂処理液は減圧濃縮により $1/20$ 程度まで濃縮し、その結果析出してくる沈澱を濾取して Part II とした。

減圧濃縮は peptide の存在のため発泡が著しくて常法では困難であつた。抑泡剤を用いても好結果は得られなかつたので常法に図のごとき改良を加えて多量の濾液を連続的に濃縮することに成功した。

この装置 (Fig. 1) は通常の減圧濃縮装置における空気導入の capillary tube の他に screw cock を附した原液自動補給用のガラス管を別に挿入する。その管の先端は capillary tube にしてクライゼンフラスコの枝より下部の器壁に接触させておく。さらに蒸溜液廃棄用の容器 (A) を図のごとく附設する。濃縮に当つては最初発泡が著しいので原液は少量入れ注意深く濃縮を始める。原液がある程度濃縮された後、減圧度を徐々に高めてゆくと水銀柱 20 mm でも発泡が著しくなくなる。かくして充分減圧された後原液補給口のコックを開き器壁に沿つて



A : bottle to abandon distilled liquid
C : capillary tube
P : pinch cock
S : screw cock
T : two way cock

Fig. 1. Apparatus for successive concentration of large amounts of solution under reduced pressure.

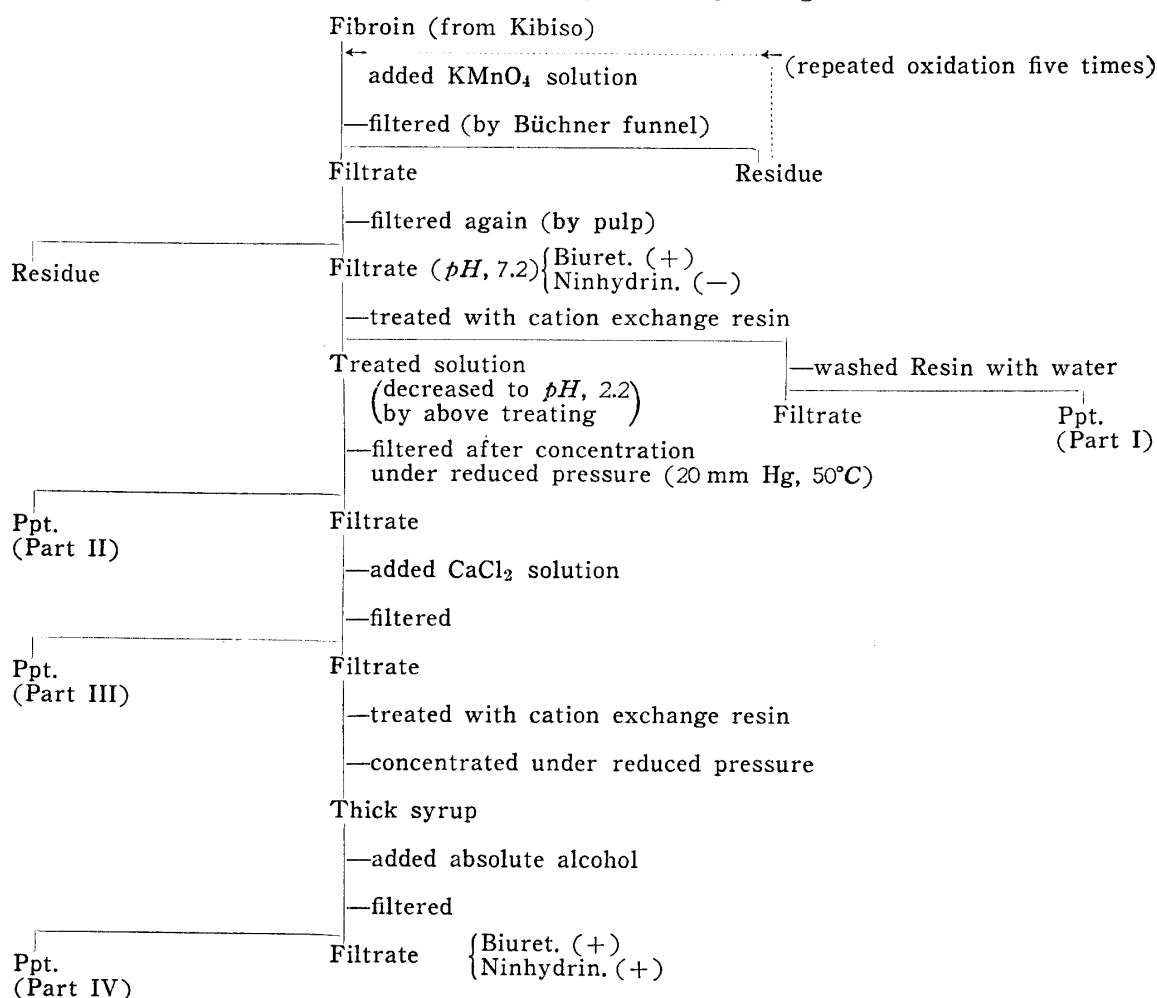
原液を滴下させると泡立ちが少なく多量の濾液を連続的に減圧濃縮できる。

なお溜出液の排除は (A) に附属する 3 ケの二方活栓 (T) 及び pinch cock を適当に操作することにより減圧度を保持しながら行うことができる。濃縮温度は約 50°C で行つた。上記方法で得られた濃縮液から沈澱 (Part II) を濾別した濾液に CaCl_2 溶液を加えて Ca-salt として沈澱を生ぜしめる。この沈澱を濾別して Part III とした。この場合 CaCl_2 溶液の添加は沈澱が完全に生成するまで行うが過剰にならぬように注意した。Part III を濾別した濾液は残存 Ca イオンをカチオン交換樹脂で除去し、処理液は前記の濃縮装置でシラップ状になるまで濃縮した。このシラップ中にはイオン交換により生成せる HCl が残存しているのでさらに水を加えて減圧濃縮を数回繰返した。

濃縮物に absolute alcohol を加えて 3 昼夜冷所に保存した後生じた沈澱を濾別して Part IV とした。alcohol の使用量は試料 100 gm の濃縮物に対し大約 700~1,000 cc の割合で用いた。

上述のごとくして得られた 4 つのフラクションの中、Part I~III は何れも水を用い、Part IV は 95% alcohol を用いて suspend し数回洗滌を繰返し最後に濾別した沈澱はデシケーター中で乾燥しメノー乳鉢を用いて粉細した。以上の過程を示せば Table 3 の通りである。

Table 3. Preparation of four fractions from the oxidative products of silk fibroin treated with potassium permanganate



(ii) 酸化濃縮液及び各フラクションの物理化学的性質

(a) 酸化濃縮液

前記のフラクション分離に用いた濃縮液について Biuret, Xanthoprotein, Millon's, Ninhydrin, 坂口反応を試みた。Biuret, 坂口反応は顕著にあらわれるが Xanthoprotein, Millon's, Ninhydrin 反応は全然認められなかつた。このことから peptide 結合は存在するが tyrosine は存在しないことが推定される。坂口反応が認められることから濾液中に arginine 残基が存在することが判り従つて arginine 残基は tyrosine 残基に比し KMnO_4 に対する酸化抵抗性が大きいことが推定される。濾液中には遊離のアミノ酸は存在しない。

(b) Part I

270°C 附近で炭化分解する微黄色の粉末として得られた。この粉末 30 mg を採り 20% HCl 10 cc を加えて 40~50 時間 100°C 湯煎中で閉管加水分解を行い、さらに湯煎上で蒸発乾涸し可及的に HCl を飛散させた後、Na OH 溶液で中和した液について paper chromatography によりアミノ酸の探索を行つた。濾紙は東洋濾紙 No. 50, 展開剤は Buthanol-acetic acid-water = 4:1:2, 発色剤は 0.2% Ninhydrin buthanol 液, 展開温度は 14~15°C で行つた。その結果は 7 個の spot が認められ対照の Rf 値から次のアミノ酸と推定した。

Aspartic acid (Rf=0.28)	Glutamic acid (Rf=0.38)	Arginine (Rf=0.16)
Glycine (Rf=0.34)	Alanine (Rf=0.43)	
Valine (Rf=0.60)	Leucine (Rf=0.72)	

これらの spot の発色状態は glycine, alanine は何れも顕著であるが他の spot は両者に比して著しく不鮮明であるから量的にも glycine, alanine は多く他のアミノ酸は少いと考えられる。

(c) Part II

Part I と同様に微黄色の粉末で 270°C で炭化分解した。前記同様の paper chromatography を行つた結果は Part I と全く同様であつた。

これらのことから Part I と II はほとんど同一物と推定される。分離の過程をみて判るごとくイオン交換により酸化液は pH の変化を起すのでそのために両者が析出するものと考えられ Part I はその際交換樹脂に吸着されたものであり Part II は吸着されなかつたものである。このことから上記のことが肯定できる。両者はそれぞれ monoamino dicarboxylic acid を含有する。しかるにこれらは水に不溶であるから N/10 Na OH に溶解し逆滴定によりその酸度を求めた。N/10 Na OH 消費量は両者ともそれぞれ 1 gm 当り 20 cc 内外であつた。Part I 及び II の生成過程では無機酸の混入は考えられないのでこの酸度は-COOH 基に起因するものと考えられる。

(d) Part III

白色の粉末で 298°C においても変化が認められなかつた。なおアミノ酸の存在も認められなかつた。それゆゑ尿酸を対照として有機酸の paper chromatography を行つた。展開剤としては水飽和 phenol, 発色剤としては Brom phenol blue を用いた。この際の spot は相当細長い形状を示したがその中心の Rf は両者とも 0.18~0.19 で同様のものが得られた。

さらに尿酸カルシウムとしての定量を試みた。Part III の Ca 量を ignition loss により求め 27.78% の Ca 量が得られた。一方尿酸カルシウム中の Ca の理論値は 27.43% であるから両者はほぼ同量である。尿酸としての還元力を KMnO_4 規定液で滴定により求めた結果は Part III では 60.36% が得られた。尿酸カルシウムにおけるその理論値は 60.25% でこれも近似値が得られた。Part III について窒素の定量を行つたがその存在は全然認められなかつた。

これらの結果から Part III は尿酸カルシウムであると考えられる。従つて絹フィブロインの酸化過程において尿酸が生成されることも確認される。

(e) Part IV

微黄色の粉末で他の3者と異なり 238°~240°C で溶融し炭化分解を始めた。

Part IV について水を溶剤として氷点降下法により分子量を測定した。その結果得られた分子量は 2,790 であった。このことから Part IV は未だ相当数のアミノ酸が結合している polypeptide 化合物であると考えられる。N/10 NaOH 消費量は Part I 及び II に類似していた。

前記同様の paper chromatography を行つた結果は Part I, II と異なり4個の spot しか認められなかつた。なお次のアミノ酸の存在を確認した。

Glycine	(Rf=0.34)	Alanine	(Rf=0.41)
Valine	(Rf=0.58)	Leucine	(Rf=0.72)

この場合も glycine, alanine の spot は特に顕著で valine, leucine のそれは極く微弱であつた。GOLDSCHMIDT⁽¹⁾ は酸化生成物から glycine, alanine のみから成るものを得ているが Part IV も大部分は glycine, alanine から成るものと考えられるので酸化度からみれば比較的近似の化合物ではないかと推定される。Part IV には微量ではあるが valine, leucine が存在するが GOLDSCHMIDT の当時はあるいはこれら微量のアミノ酸分離ができなかつたのではないとも考えられる。従つて量的にはもちろん少ないが valine, leucine のごときアミノ酸残基も MEYER⁽¹³⁾ の云う alanine, glycine を主体とする結晶部分の一連の連鎖中に存在するのではなからうかとの推察もできる。

III 要 約

著者らは KMnO_4 を用いて絹フィブロインの酸性酸化を行い、 CO_2 及び NO_2 gas の生成を確かめ、それらの定量を行つた。次ぎに絹フィブロインの中性酸化において KMnO_4 の量を異にした場合のアミノ態窒素及び tyrosine の定量を行つた。絹と同量の KMnO_4 を用いた場合酸化濃液中にはアミノ態窒素量が最も多く原絹フィブロインの約 1/3 に相当する量が溶出していることを知り得た。tyrosine はアミノ態窒素量の変化に反し少量の KMnO_4 による酸化でも急激に減少し KMnO_4 の量が多い場合には消滅する。酸化濃液中には常にほとんど存在しない。絹フィブロインの中性酸化液の減圧濃縮は通常の方法では困難であるが capillary tube を有する原液補給口を挿入することにより多量の液を連続的に容易に減圧濃縮することに成功した。酸化液より cation の除去にイオン交換樹脂を使用し酸化生成物を4つのフラクション (Part I, II, III, IV) に分離しそれらについて化学的性質を調べた結果は次ぎの通りである。

(1) Part I 及び II は炭化分解点、析出の条件、paper chromatography の結果からほぼ同一物である。何れも7種のアミノ酸、すなわち glycine, alanine, valine, leucine, arginine, glutamic acid, aspartic acid から構成される peptide 結合を有する化合物である。構成アミノ酸中、量的には glycine, alanine が特に多い。

(2) Part III は窒素を含まない。還元力、ignition loss の定量結果からこれは蓆酸カルシウムであることが判る。それゆえ、酸化過程において蓆酸の生成が確認された。

(3) Part IV は4種のアミノ酸すなわち glycine, alanine, valine, leucine から構成される peptide 結合を有する化合物である。量的には glycine, alanine が大部分で他のアミノ酸は極く少量である。

文 献

- 1) GOLDSCHMIDT u. STRAUZ : *Ann. der Chem.*, **480**, 263 (1930).
- 2) 中島 茂 ; 蚕科研彙, **2** (1), (1948).
- 3) 奥 正巳・飯田一郎 : 日蚕誌, **18**, 129 (1949).
- 4) 奥 正巳・小出直人 : 織誌, **5**, 335 (1949).
- 5) 赤堀四郎・佐竹一夫・成田耕造 : 繊維科研年報, **5**, 75 (1950).
- 6) 村瀬良一・坂口子平 : 織誌, **7**, 497 (1951).
- 7) 阿久根了 : 鹿大農学術報告, **2**, 97 (1953).
- 8) 阿久根了・古賀克也 : 同上, **2**, 103 (1953).
- 9) 農化実験書 (京大) 上巻, *p.* 229 (1952).
- 10) 町田善弘 : 日化, **69**, 176 (1948).
- 11) 阿久根了 : 鹿大農学術報告, **2**, 91 (1953).
- 12) FOLIN and MALENZ : *J. Biol. Chem.*, **83**, 89 (1929).
- 13) K.H. MEYER : *Natural and Synthetic High Polymers.*, *p.* 522 (1950).

R é s u m é

The oxidation of silk fibroin by potassium permanganate has been studied by us. The amounts of CO_2 and $\text{NO}_2\text{-N}$ produced by treating silk fibroin with potassium permanganate were quantitatively examined. $\text{NH}_2\text{-N}$ and tyrosine of which silk had been treated with different amounts of potassium permanganate were determined. The most amounts of, a third of $\text{NH}_2\text{-N}$ of silk was dissolved into the filtrate as the oxidative products being water soluble, when silk had been oxidized by the same weight of potassium permanganate. Against the variation of $\text{NH}_2\text{-N}$ tyrosine decreased by the oxidation with small amounts of potassium permanganate and disappeared by large amounts. In the oxidative products tyrosine did not always exist. Under reduced pressure the concentration of the filtrate which had been obtained by the oxidation was very difficult using common method. Therefore, we devised a modified method that should be able to easily concentrate in succession and succeeded. (Fig. 1)

Employing ion exchange resin to except cation from the filtrate, four fractions (Part I, II, III, IV) as shown in Table 3 were obtained. Chemical properties were examined about these fractions.

The results obtained were as follows:

(1) It is found by the paper chromatography that the fractions of Part I and Part II are consisted of seven amino acids glycine, alanine, valine, leucine, arginine, glutamic acid and aspartic acid, including especially large contents of glycine and alanine, and two parts are analogous or same compounds.

(2) Part III does not include nitrogen. Finding that this fraction is the same as calcium oxalate from the analysis of calcium and the reductive activity of oxalic acid, we recognized that oxalic acid is produced in the oxidative process.

(3) Part IV is consisted of four amino acids glycine, alanine, valine and leucine, including especially large contents of glycine and alanine.