防腐剤の作用機構に関する研究(第Ⅱ報)*

Formaldehyde に對する Cysteine の拮抗現象に就て

山 田 金 次 郎

(東海区水産研究所)

Studies on the Mechanism of Action of Preservatives—II.

Antagonism of Formaldehyde Action by Cysteine

Kinjiro YAMADA

In the previous paper**, it has been pointed out that the bacteriostatic action of formaldehyde is reversed by cysteine.

This report presents evidences that the reversal of formaldehyde action by cysteine is attributed to the reaction between two substances. The experimental results in support of these evidences are as follows:

(1) It is revealed from the results of azide reaction by means of paperchromatographic technique that thiazolidine-4-carboxylic acid (TCA) is formed in the broth medium to which formaldehyde and cysteine have been previously added (Table 2).

(2) The bacteriostatic action of formaldehyde is reversed strongly by cysteine, but of the other sulphhydryl compounds (i.e. thioglycolic acid and ethyl mercaptan) the reversals are not so obvious as the case of cysteine (Fig. 1).

It thus appears that when cysteine is put together with the medium containing formaldehyde, the condensation product (TCA) is formed, and when the other sulphhydryl compounds are added to the medium, the addition products are formed.

(3) According as formaldehyde is increased further in amount, nitroprusside reaction disappears from the medium containing cysteine, but does not from the other sulphhydryl compounds (Table 3). The amount of free formaldehyde which can be precipitated by methone in the analytical conditions used is decreased in the medium containing formaldehyde by increase of cysteine (Fig. 2).

From the above results it is probably assumed that the reversing trends (Fig. 1) are different according to the affinities between each of three kinds of sulphhydryl compounds and formaldehyde.

緒 言

第Ⅰ報に於ては Formaldehyde の静菌作用が Cysteine に依り拮抗されることを明かにした。

抗菌性物質の作用が Cysteine その他の SH 化合物に依つて拮抗される現象は砒素化合物¹⁾, 昇汞²⁾, Quinone 化合物³⁾ 及びその他の α , β -不飽和 Ketone 類⁴⁾ に於ても見られる現象であつて, CAVALLITO

* 1952年5月3日受理 東海区水産研究所業績B第85号, (印刷費負担)

** Bull. Japan. Sci. Fish., 17 (6), 161, 1951.

は更に多くの化学構造を異にする抗菌性物質が Cysteine その他の SH 化合物に依り拮抗されることを認め、且この現象が抗菌性物質と SH 化合物との反応性に依るものであることを確認し、抗菌性物質群には SH 基との反応性に依つて菌の生育を阻害する一群の物質が存在することを明かにした。⁵⁻¹¹⁾

Formaldehyde が常温に於て Cysteine と反応し Thiazolidine-4-carboxylic acid (TCA) を形成することは既に文献に記載され¹²⁾, RATNER 等¹³⁾ はこの反応速度が酸性より中性に近くなるに従つて増大することを報告し, WADSWORTH 等¹⁴⁾ は Formaldehyde と Cysteine との結合力が他の Amino 酸に比較し強いことを見ている。従つて Formaldehyde の静菌作用が Cysteine により拮抗されることは両物質間の反応性に依るものであることが考え得られる。著者はこの点に関し若干の実験を行い拮抗現象が Formaldehyde と Cysteine との反応性に依るものであることを確認したのでその結果を此処に報告する。

実験及び結果

I. 培地に於ける Formaldehyde と Cysteine の反応生成物に就て

i) TCA の Azide 反応: 供試 TCA は RATNER 等¹³⁾ の方法によつて作製した。則ち Cysteine 塩酸塩 3g を採り之に 36% Formalin 2.5 cc を加え一夜室温に放置する。之に Pyridine 2.5 cc を加え攪拌するときは無色長針状の結晶を析出する。之に純 Alcohol 5 cc を加え結晶を濾過し乾燥する。収量 2.3 g。更に熱水にて再結晶を行い、Alcohol で 2 回洗う。かくして得たる物質は N 量 (Micro-kjeldahl 法) 10.4% (理論値 10.5%), 融点 198°C, 冷水にやや難溶, 温水に可溶, Ninhydrin 反応陽性にして Nitroprusside 反応陰性, その性質は RATNER 等の得たる TCA のそれと合致する。

M/100 沃度液 10 cc に M/50 Na-azide 液 10 cc を加え之に作製せる M/100 TCA 液 2 cc を加えるときは直ちに脱色し澱粉液を加えるも青色を呈しない。Na-azide 沃度液 (1.5% Na-azide, 0.05M 沃度液) を指示薬とし, 0.07% Ammonia 飽和石灰酸溶液を展開剤として使用し, Paper-chromatograph 法で 1.0 % TCA 液を展開するときは Rf 0.69 の位置に白色の斑点を生ずる。尙使用濾紙は東洋濾紙の No. 2 であつて, 展開時間は室温に於て 5~6 時間であつた。

ii) 緩衝液に於ける TCA の形成: i に於て TCA が Na-azide に依り検出し得ることが明かになつたので, 静菌試験と同程度の濃度の Formaldehyde 緩衝液に Cysteine を加えた際 TCA が検出し得るや否やを調べた。則ち MICHAELIS の磷酸緩衝液 (pH 7.0) 10 cc を採り之に 0.094% Formaldehyde 溶液*を 0.50 cc 加え更に 1.0% 塩酸 Cysteine 溶液を 0.10 cc より 1.00 cc 迄添加し 18 時間, 30°C に放置した。全操作は総て無菌的に行つた。放置後 Paper-chromatograph 法により Na-azide 沃度液を指示薬とし 0.07% Ammonia 飽和石灰酸を展開剤として生成物を分離した結果は第 1 表に示す如くである。この結果

Table 1. Formation of thiazolidine-4-carboxylic acid (TCA) in buffer solution.

Formaldehyde added	Cysteine added	Rf value	
		0.43 (Cysteine)	0.69 (TCA)
0 cc	0.10 cc	+	—
0.50	0.10	—	+
0.50	0.20	—	+
0.50	0.30	—	+
0.50	0.40	+	+
0.50	0.50	+	+

* 本報に於ける Formaldehyde の定量は沃度法に依つて行つた。

0.50	0.6	+	+
0.50	0.70	+	+
0.50	0.80	+	+
0.50	0.90	+	+
0.50	1.00	+	+

より塩酸 Cysteine の添加量が僅か 0.10 cc (添加 Formaldehyde に対する Mol 比 2:1) に於ても明かに TCA が検出し得ることが判る。尙塩酸 Cysteine の添加量が 0.40 cc (添加 Formaldehyde に対する Mol 比 1:2) 以上のとき Cysteine (Rf 0.43) が検出し得られるのは, Formaldehyde と Cysteine との反応系に於て過剰の Cysteine が存在し, Cysteine も亦 Azide 反応を呈する為である。¹⁵⁾

iii) 肉汁培地に於ける TCA の形成: ii の緩衝液のかわりに肉汁培地を使用して同様な方法で TCA が検出し得るや否やを調べた。則ち肉汁培地 (武田ベプトン 10g, ミクニ肉エキス 10g, 食塩 5g, 水 1l) 10cc に 0.094% Formaldehyde 溶液を 0.50 cc 加え, 更に 1.0% 塩酸 Cysteine 溶液を 0.10 cc より 1.00 cc 迄添加し, 実験 ii と同様の方法に依り TCA の検出を行つた。その結果は第2表に示す如くである。第2表より Formaldehyde に対し当量以下の Cysteine 添加 (0.10 cc) に於ても, 第1表と同様 TCA

Table 2. Formation of thiazolidine-4-carboxylic acid (TCA) in broth medium.

Formaldehyde added	Cysteine added	Rf value	
		0.43 (Cysteine)	0.69 (TCA)
0 cc	0.10 cc	+	—
0.50	0.10	—	+
0.50	0.20	—	+
0.50	0.30	—	+
0.50	0.40	—	+
0.50	0.50	+	+
0.50	0.60	+	+
0.50	0.70	+	+
0.50	0.80	+	+
0.50	0.90	+	+
0.50	1.00	+	+

が検出され得ることが判る。尙肉汁培地そのものは使用条件下で Na-azide 反応により検出し得る物質を含まなかつた。

II. Sulfhydryl 化合物の拮抗力の相異

肉汁培地 10 cc に 0.095% Formaldehyde 溶液 0.50 cc を加え, 之に 1.0% SH 化合物を 0.10 cc より 1.00 cc 迄無菌的に添加し, 継代培養せる大腸菌を一白金耳接種し 30°C, 18 時間培養後に菌の生育を比濁法に依つて測定した。使用した SH 化合物は塩酸 Cysteine (武田), Thioglycollic acid (武田), Mercaptan (武田) である。尙塩酸 Cysteine, Thioglycollic acid は 1.0% 水溶液を 20 分間蒸気殺菌* したものを使用し, Mercaptan は無菌的に殺菌水に添加し 1.0% 水溶液を作製した。得られた結果は第1図の如くであつて, 塩酸 Cysteine の添加量が 0.30 cc (添加 Formaldehyde に対する Mol 比 1:1) 以上では

* 塩酸 Cysteine と Thioglycollic acid の力価は 20 分蒸気殺菌により変化しないことを Ferricyanide 法¹⁷⁾ により確めた。

A: Growth curve in the broth medium containing formaldehyde
B: Growth curve in the broth medium not containing formaldehyde

Fig. 1. Effect of sulfhydryl compounds on the bacteriostatic action of formaldehyde.

は Nitroprusside 反応が消滅する Cysteine 対 Formaldehyde の Mol 比は緩衝液で 1:1, 肉汁培地で 1:2 であるに反し, Thioglycollic acid 及び Mercaptan の場合には Mol 比が夫々 1:6, 1:4 に於ても反応は消滅しない。

ii) Formaldehyde-Methone の生成: 磷酸緩衝液又は肉汁培地 40 cc に 0.092% Formaldehyde 溶液 2 cc を加え, 之に 1.0% 塩酸 Cysteine, Thioglycollic acid, Mercaptan 水溶液を 0.50 cc より 2.50 cc 迄添加した。全操作は無菌的に行つた。30°C, 18時間放置後 4.0% Methone アルコール溶液を 5 cc 加え更に 4時間室温に放置後生成せる Formaldehyde-Methone の結晶を Gooch 坩堝に集め, 蒸留水で洗い乾燥後秤量して “Free Formaldehyde”^{*} 量を定量した。その結果は第 2 図の如くであつて, この結果より Cysteine の場合には緩衝液に於ても又肉汁培地に於ても “Free Formaldehyde” は塩酸 Cysteine の添加

菌の生育に対する Formaldehyde の影響が消滅し, Cysteine は明瞭に Formaldehyde と拮抗する。之に反し Thioglycollic acid 及び Mercaptan は Formaldehyde 添加培地に於て或る濃度, 則ち Thioglycollic acid の場合には 0.20 cc (Mol 比 1:1), Mercaptan の場合には 0.30—0.40 cc (Mol 比 1:3—4) を境として菌の生育は増加より減少の方向をとるものの如くであるが, その生育曲線は Formaldehyde 無添加生育曲線と交差せず Cysteine の場合程その拮抗現象は明瞭でない。

III. Formaldehyde と Sulphydryl 化合物との結合力

i) Nitroprusside 反応: 磷酸緩衝液又は肉汁培地 10 cc に 10% 塩酸 Cysteine, Thioglycollic acid, Mercaptan 水溶液を 0.50 cc 加え, 之に 0.92% Formaldehyde 溶液を 0.10 cc より 1.00 cc 迄添加し全操作は無菌的に行つた。30°C, 18時間放置後に 10% 苛性ソーダ 0.50 cc, 0.5% Nitroprusside 溶液 3 滴を加え, Nitroprusside 反応を調べた結果は第 3 表に示す如くである。この結果より Cysteine の場合は緩衝液に於て 0.10 cc, 培地に於て 0.20 cc の Formaldehyde の添加により Nitroprusside 反応が消滅するも, Thioglycollic acid 及び Mercaptan の場合には 1.00 cc の添加量に於ても反応が消滅しないことが判る。則ち Cysteine の場合に

* 定量条件下で Methone と結合し得る Formaldehyde を云ふ。¹⁴⁾

Table 3. Nitroprusside tests for the buffer solution and the broth medium containing sulphhydryl compounds in the presence of excess of formaldehyde.

Formaldehyde added	cc	Sulphydryl compounds					
		In buffer solution			In broth medium		
		Cysteine	Thioglycollic acid	Mercaptan	Cysteine	Thioglycollic acid	Mercaptan
0	cc	++	+++	+++	++	+++	+++
0.10		—	+++	+++	+	+++	+++
0.20		—	+++	+++	—	+++	+++
0.30		—	+++	+++	—	+++	+++
0.40		—	+++	+++	—	+++	+++
0.50		—	+++	+++	—	+++	+++
0.60		—	+++	+++	—	+++	+++
0.70		—	+++	+++	—	+++	+++
0.80		—	+++	+++	—	+++	+++
0.90		—	+++	+++	—	+++	+++
1.00		—	+++	+++	—	+++	+++

Nitroprusside test was slightly positive (+) in the used medium not treated with sulphhydryl compounds and formaldehyde.

Fig. 2. Reactions of sulphhydryl compounds to formaldehyde in buffer solution and broth medium.

量の増大に伴つて減少することが判る。一方 Thioglycollic acid, Mercaptan は緩衝液に於てその添加量の増大に伴い、“Free Formaldehyde” が或る程度減少するが、肉汁培地に於ては逆に増加する。この傾向は Thioglycollic acid に於て著しい。このことは培地に両物質と反応する物質が存在し、為に Cysteine と異つた結果を示すものであらう。この点に関しては更に研究を行う必要がある。

考 察

RATNER 等¹³⁾ は Formaldehyde と Cysteine との反応に於て Formaldehyde が先づ Cysteine の SH 基と結合して附加物を形成し、次に縮合作用に依り TCA が形成され、しかもその反応速度は中性に於て速かであることを報告している。従つて Formaldehyde の静菌作用に対する Cysteine の拮抗現象が両物質間の反応性に基くものとすれば、菌培地に Formaldehyde と Cysteine とを加えた場合、Formaldehyde と Cysteine との附加物ではなく、脱水物たる TCA の形成が考え得られる。よつて著者は先づ RATNER 等の方法に依り TCA を作製し、この物質が Na-azide による沃度の酸化に対し触媒作用を有することを認め、Paper-chromatograph 法によりその Rf を確定し、次で同法により菌培地に Formaldehyde と Cysteine とを加えた場合 TCA が形成されることを確認した(第2表)。

SH 化合物は Aldehyde 類と反応して脱水物又は附加物を形成する。Cysteinè 又は Pseudo 形—Thiourea $\text{HS}\cdot\text{C}(\text{NH}_2):\text{NH}$ の如き SH 基に隣接して遊離 Amino 基を有している物質は脱水物を形成し、Thioglycollic acid の如き遊離 Amino 基を有していない物質は単に附加物を形成する。¹²⁾¹⁶⁾ 従つて Formaldehyde と Cysteine との拮抗作用が脱水物たる TCA の形成によるものであるとすれば、附加物を形成する Thioglycollic acid 又は形成すると考えられる Mercaptan を Formaldehyde 添加培地に加えるときは、Cysteine と異つた菌の生育曲線が得られることが考えられる。このことは第1図によつて確認し得た。則ち Cysteine は明瞭に Formaldehyde に拮抗するに対し、Thioglycollic acid 及び Mercaptan に於ては明瞭な拮抗作用を認めることが出来なかつた。

この現象は脱水物たる TCA が Nitroprusside 反応を呈せず、附加物たる Formaldehyde-Thioglycollic acid が容易にもとの二成分に解離し Nitroprusside 反応を呈することより、¹²⁾¹³⁾ Formaldehyde と SH 化合物間の結合力の相異によるものと考え得られる。よつて Nitroprusside 反応並に “Free Formaldehyde” 量より Formaldehyde と SH 化合物との結合力の強さを調べ、この現象が両物質間の結合力の相異によることを確めた(第3表、第2図)。この関係は第2図の結果より緩衝液に於ける添加 SH 化合物の Mol

Fig. 3. Quantitative relations between free formaldehyde and sulfhydryl compounds when added in buffer solution.

濃度と “Free Formaldehyde” 量とを対比せる第3図と、SH 化合物の拮抗力を調べた第1図とを比較することより一層明瞭となる。則ち第3図より Cysteine の Formaldehyde に対する結合力の強さが Thioglycollic acid 並に Mercaptan のそれより強いことは、Formaldehyde に対する SH 化合物の拮抗作用(第1図)に於て、Cysteine が明瞭に Formaldehyde に対し拮抗するに対し、Thioglycollic acid、Mercaptan の拮抗力が明瞭でないことを説明し得る。

以上述べた結果によつて、Formaldehyde の静菌作用に対する Cysteine の拮抗現象は両物質間の反応性によるものであると結論することが出来る。

終りに臨み御指導並に御助言を賜つた右田正男博士、鉄本総吾博士及び天野慶之氏に深謝の意を表する。

文 献

- 1) VUEGTLIN, C., DYER, H. A. & LEONARD, C. S. : *Pub. Health Rept.*, **38**, 1882 (1923).
- 2) FILDERS, P. : *Brit. J. Exp. Path.*, **21**, 67 (1940).
- 3) 林 : 薬学, **4**, 60 (1950).

- 4) GEIGER, W.B. & CONN, J.E. : *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 112 (1945).
- 5) CAVALLITO, C.J. & BAILEY, J.H. : *Science*, **100**, 390 (1944).
- 6) CAVALLITO, C.J., BAILEY, J.H., HASKELL, T.H., McCORMICK, J.R. & WARNER, W.F. : *J. Bact.*, **50**, 61 (1945).
- 7) CAVALLITO, C.J. & HASKELL, T.H. : *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1991 (1945).
- 8) BAILEY, J.H. & CAVALLITO, C.J. : *J. Bact.*, **51**, 592 (1946).
- 9) CAVALLITO, C.J. : *J. Biol. Chem.*, **164**, 29 (1946).
- 10) KLIMEK, J.W., CAVALLITO, C.J. & BAILEY, J.H. : *J. Bact.*, **55**, 139 (1948).
- 11) BAILEY, J.H. & CAVALLITO, C.J. : *J. Bact.*, **55**, 175 (1943).
- 12) SCHUBERT, M.P. : *J. Biol. Chem.*, **114**, 341 (1936).
- 13) RATNER, S. & CLARKE, H.T. : *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 200 (1937).
- 14) WADSWORTH, A. & PANGBORN, M.C. : *J. Biol. Chem.*, **116**, 423 (1936).
- 15) CHARGAFF, E., LEVINE, C. & GREEN, C. : *J. Biol. Chem.*, **175**, 67 (1948).
- 16) SCHUBERT, M.P. : *J. Biol. Chem.*, **111**, 671 (1935).
- 17) 森, 泰 : 日水誌, **15**, 407 (1949).