グリシンと二、三の薬剤の抗菌力併用効果

(昭和 59 年 11 月 5 日受理)

李 在 根^{*1} 竜 口 和 恵^{*2}
堤 將 和^{*2,*3} 渡 辺 忠 雄^{*2}

Combined Antimicrobial Effects of Glycine and Several Reagents

Jea Kyum LEE^{*1}, Kazue TATSUGUCHI^{*2}, Masakazu TSUTSUMI^{*2,*3}
and Tadao WATANABE^{*2}

(^{*1}Sunchon National College: #315 Megok-Dong, Suncheon City, Cheonnan, Korea;

^{*2}Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University: 6-10-1 Hakozaki, Fukuoka, Japan; Present address, ^{*3}Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ibaragi University: 3998 Ami, Inashiki, Ibaragi, Japan)

The combined antimicrobial effects of glycine and several reagents were examined to evaluate glycine as a food preservative. The following reagents were effective: hexameta-phosphate and ethylenediaminetetraacetate (which has a chelating action) against *Staphylococcus aureus* IFO 3060; sodium chloride against *Escherichia coli* IFO 3301 and *Staphylococcus aureus* FUCi; lysozyme against *Staphylococcus aureus* 209P. The combined effects of glycine and sodium chloride on *Escherichia coli* IFO 3301 were examined. The cells grown in sodium chloride-containing medium became sensitive to glycine, whereas those cells simply treated with sodium chloride did not. It is suggested that the antimicrobial activity of glycine was enhanced through the injury to the bacterial surface caused by sodium chloride during cell growth.

(Received November 5, 1984)

Key words: グリシン glycine; 抗菌力 antimicrobial activity; 抗菌力併用効果 combined antimicrobial effects

グリシンはさわやかな甘味を有するアミノ酸であるが細菌の生育を阻害する^{1)~3)}ことから、甘味・旨味料としてだけでなく水産物製品の“ネット”発生防止などの防腐効果をねらった製品も商品化されている。グリシンの抗菌作用の本質は、細菌のスフェロプラスチ化などを引き起こすことにより、ペニシリンと同様に細胞壁合成の阻害^{4)~7)}にあると考えられている。

グリシンは動植物に広く分布し、最も構造の簡単なアミノ酸であるので、安全な食品保存料として用いる物

質の一つであると考えられる。しかし、グリシンの抗菌作用は強いものではなく、生育阻害を引き起こすには通常1%以上の濃度を必要とする。従ってグリシンを保存料として用いるには、その抗菌力を高める補助手段が必要となろう。そこで本研究においては5種の菌株を選び、これらに対してグリシンと併用することによって抗菌力を増大させる薬剤を検出することを目的とした。その結果、相加効果が見出された大腸菌における塩化ナトリウムとの併用について、若干の検討を加えた。

実験材料及び方法

1. 使用菌株

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* の5種類の細菌を実験に使用した。このうち *S.*

*1 順天大学：韓国全南順天市梅谷洞 315

*2 九州大学農学部食糧化学工学科：福岡市東区箱崎 6-10-1

*3 現所属茨城大学農学部畜産学科：茨城県稲敷郡阿見町 3998

aureus 209 P, FUci は福岡歯科大学細菌学教室から、これら以外の菌株はすべて財団法人発酵研究所 (IFO) から分譲をうけたものである。

2. 供試薬剤

ヘキサメタリン酸塩 (HP) はポリホス化学 (株) 製、食品添加物用を、コール酸ナトリウム (CA), グリシンは半井化学 (株) 製、特級を、塩化ナトリウムは半井化学 (株) 製、一級を、カプリン酸モノグリセライド (MC₁₀) は太陽化学 (株) 製、食品添加物用を、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) は同仁化学 (株) 製、特級を、リゾチームは (株) キューピー製、純度 99.5% の製品を用いた。

3. 培地

培養にはポリペプトン (大五栄養化学 (株) 製) 1%, エーレルリヒ肉エキス (極東化学 (株) 製) 1%, pH 7.0 の液体培地を用いた。

4. 抗菌力の測定方法

培地 8.5ml を含む試験管に、1 夜 30° で前培養した菌液-OD₆₆₀ 値を 0.3 に調整したもの-を 0.5 ml と薬

剤の終濃度が所定濃度になるように、20 倍濃厚液 0.5 ml を加えるか、あるいは結晶を加え溶解後、滅菌水で 10 ml にした後、30° で 24 時間振とう培養を行った。培養終了時と開始時との OD₆₆₀ 値の差が 0.04 以下を生育阻止として最小生育阻止濃度 (MIC) を求めた。なお OD の測定には東京光電 (株) 製モデル 1 型光度計を用いた。またグリシンと各種薬剤の併用時には、それぞれの MIC 以下の濃度で同様に実験を行った。

実験結果及び考察

1. 供試薬剤の MIC

実験に用いた菌株に対するグリシン及び他の薬剤の MIC を Table 1 に示した。グリシンの MIC は *Ps. fluorescens* の 0.4% を除けば、1% 以上の高濃度であった。特に *S. aureus* IFO 3060, *P. vulgaris* IFO 3045 は 5% の濃度でも生育は阻止されなかった。

2. グリシンと各種薬剤の併用効果

グリシンの抗菌作用を高める物質の検索のため最初に、現在まで当研究室で安全性の高い食品保存料として用いる薬剤として抗菌作用を検討してきた HP,

Table 1. Minimum Inhibitory Concentrations of Glycine and Several Reagents

Bacteria	Reagents (%)						
	Gly	HP	CA	MC ₁₀	EDTA	NaCl	Lyso
<i>S. aureus</i> IFO 3060	>5	<0.2	0.2	0.02	0.04	>6	>1
<i>S. aureus</i> 209P	2.75	0.1	—	—	—	>6	>1
<i>S. aureus</i> FUci	3.75	0.1	—	—	—	>6	>1
<i>B. subtilis</i> IFO 3037	1	0.1	0.3	0.02	0.01	>6	<0.005
<i>Ps. fluorescens</i> IFO 3081	0.6	0.06	2	0.01	0.01	3	<0.5
<i>P. vulgaris</i> IFO 3045	>5	>1	>3	0.2	1	>6	>1
<i>E. coli</i> IFO 3301	2	>1	>1	0.3	1	>6	>1

Abbreviations: Gly, glycine; HP, hexametaphosphate; CA, cholic acid sodium salt; MC₁₀, glycerol monocaprate; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; Lyso, lysozyme

Table 2. Combined Effects of Glycine and Hexametaphosphate

Bacteria	HP (%)	Gly (%)									
		0.08	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2	3	4	5
<i>S. aureus</i> IFO 3060	0.1	≡	≡	≡	≡	+	±	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i> IFO 3037	0.05	≡	≡	+	±	—
<i>Ps. fluorescens</i> IFO 3081	0.05	+	±	—
<i>P. vulgaris</i> IFO 3045	1	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
<i>E. coli</i> IFO 3301	1	≡	≡	≡	+	±	±

Growth was graded as following: the increase at OD₆₆₀; under 0.04, —; 0.05~0.09, ±; 0.10~0.19, +; 0.20~0.29, ≡; above 0.30, ≡

The shadowing areas in Table 2~7 show the minimum inhibitory concentrations or above of glycine to the bacteria.

Table 3. Combined Effects of Glycine and Ethylenediaminetetraacetate

Bacteria	EDTA (%)	Gly (%)									
		0.08	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2	3	4	5
<i>S. aureus</i> IFO 3060	0.03	⦚	⦚	⦚	⦚	+	—	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i> IFO 3037	0.008	⦚	⦚	+	±	—
<i>Ps. fluorescens</i> IFO 3081	0.006	+	±	±
<i>P. vulgaris</i> IFO 3045	1	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚
<i>E. coli</i> IFO 3301	0.1	⦚	⦚	+	±	—	—

Growth was graded as Table 2.

Table 4. Combined Effects of Glycine and Glycerol Monocaprate

Bacteria	MC ₁₀ (%)	Gly (%)										
		0.08	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2	3	4	5	
<i>S. aureus</i> IFO 3060	0.01	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	
<i>B. subtilis</i> IFO 3037	0.01	⦿	⦿	±	—	—
<i>Ps. fluorescens</i> IFO 3081	0.008	+	±	—								
<i>P. vulgaris</i> IFO 3045	0.1	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	
<i>E. coli</i> IFO 3301	0.1	⦿	⦿	+	±	—	—

Growth was graded as Table 2.

Table 5. Combined Effects of Glycine and Cholic Acid Sodium Salt

Bacteria	CA (%)	Gly (%)										
		0.08	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2	3	4	5	
<i>S. aureus</i> IFO 3060	0.1	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	+	—	—	
<i>B. subtilis</i> IFO 3037	0.1	⦚	⦚	⦚	+	+	<div></div>					
<i>Ps. fluorescens</i> IFO 3081	1	⦚	+	—								
<i>P. vulgaris</i> IFO 3045	1	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	⦚	
<i>E. coli</i> IFO 3301	3	⦚	⦚	⦚	+	+	±	<div></div>				

Growth was graded as Table 2.

EDTA, MC₁₀, CA, 塩化ナトリウム, リゾチームについて検討した。まずグリシンと HP の併用においては (Table 2), *S. aureus* IFO 3060 と *B. subtilis* IFO 3037 で弱い併用効果が認められた。HP の抗菌力の一要因はキレート作用であるが⁸⁾, HP よりキレート生成力が強い EDTA では併用効果が強くなることが認められた (Table 3)。

界面活性作用を持つ MC₁₀ の併用においては (Table

4), *B. subtilis* IFO 3037 と *E. coli* IFO 3301 で弱い併用効果が認められた。同じく界面活性作用を持つ CA は MC₁₀ よりその効果は低く, わずかに *S. aureus* IFO 3060 で弱い併用効果が認められるにすぎなかった (Table 5)。

塩化ナトリウムのグリシンの抗菌力に及ぼす影響は Table 6 に示した。耐塩性の高い *S. aureus* の中で FUCi 株においてグリシンとの併用効果が認められた

Table 6. Combined Effects of Glycine and Sodium Chloride

Bacteria	NaCl (%)	Gly (%)									
		0.08	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2	3	4	5
<i>S. aureus</i> IFO 3060	5	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	+
<i>S. aureus</i> 209P	5	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡		
<i>S. aureus</i> FUci	3	≡	≡	≡	≡	+	+	+	+		
<i>B. subtilis</i> IFO 3037	3	≡	≡	≡	+	+					
<i>Ps. fluorescens</i> IFO 3081	1	≡	+	±							
<i>P. vulgaris</i> IFO 3045	5	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	+	±
<i>E. coli</i> IFO 3301	3	≡	+	±	+	+	+	+			

Growth was graded as Table 2.

Table 7. Combined Effects of Glycine and Lysozyme

Bacteria	Lyso (%)	Gly (%)									
		0.08	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2	3	4	5
<i>S. aureus</i> IFO 3060	1	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	+
<i>S. aureus</i> 209P	0.01	≡	≡	+	±	+	+	+	+		
<i>S. aureus</i> FUci	1	≡	≡	≡	≡	+	+	+	+		
<i>B. subtilis</i> IFO3037	0.005	+	+	+	+	+					
<i>Ps. fluorescens</i> IFO 3081	0.5	≡	≡	≡							
<i>P. vulgaris</i> IFO 3045	1	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
<i>E. coli</i> IFO 3301	1	≡	≡	≡	≡	≡	+	+	+		

Growth was graded as Table 2.

他, *E. coli* IFO 3301 においても併用効果が観察された。*E. coli* におけるグリシンと塩化ナトリウムの併用効果は, 0.5% グリシンと 3% 塩化ナトリウムで菌の生育が完全に阻止され, 相加効果を示した。*S. aureus* FUci 株においても, グリシン 2% と塩化ナトリウム 3% との併用によって生育が阻止され, その効果は相加的であった。

グリシンとリゾチムの併用効果については Table 7 に示した。リゾチム単独では 1% 以上の濃度に対しても抵抗性である *S. aureus* FUci と 209 P においてグリシンとの併用効果が認められ, 特に 209 P においては, グリシン 1% とリゾチム 0.005% 及びグリシン 0.8% とリゾチム 0.008% で完全に生育を阻止した。これは吉武, 赤塚の報告⁹⁾と同様の結果であった。リゾチムは細菌のペプチドグリカンの糖鎖を切断し溶菌に導くが, *Staphylococcus* 属は *N*-アセチルムラミン酸の C₆

が *O*-アセチル化されているため, リゾチム非感受性であると考えられ¹⁰⁾, *S. aureus* 209 P においてグリシンの併用によって顕著な抗菌力増大が認められたことは興味深い。

P. vulgaris においては試験したすべての薬剤でグリシンとの併用効果が全く認められず, さらに検索する必要がある。*Staphylococcus* 属は全体としてグリシンに対して抵抗性であったが, その中で EDTA, 塩化ナトリウム及びリゾチムなどにより併用効果を示す菌株がそれぞれ見出されたので, その表層構造の変化と併用効果機作の研究にとって良い材料になると考えられる。

3. *E. coli* に対するグリシンと塩化ナトリウムの併用効果

グリシンまたは塩化ナトリウム単独, 及び両者併用時の生育曲線を Fig. 1 に示した。グリシン 0.5% と塩化ナトリウム 3% またはグリシン 1% と塩化ナトリウム

Fig. 1. Growth curves of *Escherichia coli* IFO 3301 in the presence of glycine and/or sodium chloride

(A), in the presence of only sodium chloride: $\circ$ —, control; $\triangle$ —, 1%; ∇ —, 2%; $\square$ —, 3%; $\diamond$ —, 4%; $\blacktriangle$ —, 5%; (B), in the presence of only glycine: $\bullet$ —, 0.5%; $\blacktriangle$ —, 1%; $\blacktriangledown$ —, 1.5%; $\blacksquare$ —, 2%; (C), in the presence of 0.5% glycine plus sodium chloride: $\bullet$ —, only 0.5% glycine; $\blacktriangle$ —, plus 1% sodium chloride; $\blacktriangledown$ —, plus 2% sodium chloride; $\blacksquare$ —, plus 3% sodium chloride; (D), in the presence of 1% glycine plus sodium chloride: $\blacktriangle$ —, only 1% glycine; $\blacktriangledown$ —, plus 1% sodium chloride; $\blacksquare$ —, plus 2% sodium chloride

Fig. 2. Effects of addition of glycine and/or sodium chloride to the culture of log phase

(A), addition of glycine: $\circ$ —, control; $\bullet$ —, 0.5%; $\blacktriangle$ —, 1%; $\blacktriangledown$ —, 2%; (B), addition of sodium chloride: $\triangle$ —, 0.5%; ∇ —, 1%; $\square$ —, 2%; $\diamond$ —, 3%; (C), addition of 0.5% glycine and 1~3% sodium chloride; (D), addition of 1% glycine and 1~3% sodium chloride: $\circ$ — in (C) or (D), only 0.5% or 1% glycine; $\blacktriangledown$ —, $\blacksquare$ —, $\blacklozenge$ — in (C) or (D); 0.5% or 1% glycine plus 1, 2 or 3% sodium chloride.

The arrows in respective figures show the addition time of glycine and/or sodium chloride.

Fig. 3. Effects of addition of glycine to sodium chloride-containing culture of log phase (A), (B) or (C) represent 0.5, 1 or 2% sodium chloride containing culture, respectively. The arrows in respective figures show the addition of glycine: $\circ$ —, control; $\bullet$ —, $\blacktriangle$ —, $\blacktriangledown$ —; addition of 0.5, 1, 2% glycine.

Fig. 4. Effects of glycine or sodium chloride on the cells grown in nutrient broth and effects of glycine on the cells grown in sodium chloride containing nutrient broth.

(A), addition of glycine; (B), addition of sodium chloride; (C), (D), (E); addition of glycine to the cells from 0.5, 1, 2% sodium chloride containing culture: $\circ$ —, control; $\bullet$ —, $\blacktriangle$ —, $\blacklozenge$ —; 0.5, 1, 2% glycine: $\triangle$ —, ∇ —, $\square$ —; 1, 2, 3% sodium chloride

2% の併用により菌の生育は完全に阻止された。

グリシンを対数増殖期の菌に添加すると、約 4 時間後から OD の低下が認められ、溶菌が起ることが示唆された (Fig. 2 (A))。塩化ナトリウム添加では全く溶菌現象は認められず (Fig. 2 (B))、むしろグリシンによる溶菌を抑制することが認められた (Fig. 2 (C), (D))。なお、塩化ナトリウム添加の際には必ず観察される OD の一時的増加は塩析によるものと思われる。

しかしながら、0.5~2% の塩化ナトリウムを含む培地で生育させた菌にグリシンを添加すると、溶菌現象が観察された。特に 2% 塩化ナトリウム含有培地で生育した菌は、通常は全く生育にも影響を与えず溶菌も起さない 0.5% グリシンの添加によっても溶菌し (Fig. 3 (C))、グリシン感受性となっていることを示した。

以上の実験結果は塩化ナトリウム存在下で菌が生育した場合のみグリシンの抗菌力が増大し、単に処理を行った場合には、環境に適応する菌体の変化はむしろグリシンの作用を抑制することを示しており、菌体表層の変化との関連でさらに研究する必要がある。

対数増殖期まで生育した菌体を集菌・洗浄後、0.05 M リン酸緩衝液に懸濁して濁度を観察すると、グリシン 2% の添加でも濁度の低下はわずかであり、塩化ナトリウム添加の場合にはほとんど認められなかった (Fig.

4 (A), (B))。しかし塩化ナトリウム含有培地で生育した菌にグリシンを添加すると、顕著な濁度低下が認められるようになった (Fig. 4 (C), (D), (E))。この原因として塩化ナトリウム存在下で損傷を受けた菌はグリシンによって容易に溶菌する (Fig. 3) ことに加え、塩化ナトリウム含有培地から 0.05 M リン酸緩衝液への浸透圧低下に対して、表層が耐え得る構造を持っていなかったこともその要因となっていると考えられる。以上のように *E. coli* IFO 3301 に対するグリシンと塩化ナトリウムの併用効果は塩化ナトリウム存在下で生育した菌においてのみ観察され、生育環境の塩化ナトリウムに対する菌体表層の変化により、グリシンの抗菌力が増大するものと考えられた。これらについては菌体表層の形態及び表層を構成する成分の変化などを通じて、さらに検討する必要がある。

要 約

1. グリシンと抗菌力併用効果を示す薬剤として、*S. aureus* IFO 3060 にはキレート作用を持つヘキサメタリン酸塩、EDTA が、*E. coli* IFO 3301 及び *S. aureus* FUci では塩化ナトリウム、*S. aureus* 209 P ではリゾチームが見出された。

2. *E. coli* IFO 3301 に対するグリシンと塩化ナトリウムとの併用効果は、塩化ナトリウム存在下で生育した菌においてのみ観察され、塩化ナトリウムによる菌体表層の損傷により、グリシンの抗菌力が高められるものと推察した。

文 献

- 1) Michel, M. F., Gordon, M.: J. Path. Bact. **55**, 63~68 (1943).
- 2) 駒形和男, 小川博望, 福島 清, 伊藤 武: 食衛誌, **9**, 289~294 (1968).
- 3) Hishinuma, F., Izaki, K., Takahashi, H.: Agric. Biol. Chem. **33**, 1577~1586 (1969).
- 4) Dienes, H., Weinberger, H. J., Madoff, S.: J. Bacteriol. **59**, 755~764 (1950).
- 5) Welsch, M., Osterieth, P.: J. Microbial. Serol. **24**, 257~272 (1958).
- 6) Strominger, J. L., Birge, C. H.: J. Bacteriol. **89**, 1124~1127 (1965).
- 7) Hishinnma, F., Izaki, K., Takahashi, H.: Agric. Biol. Chem. **35**, 2050~2058 (1971).
- 8) 小沢樹夫, 太田斐子: 食衛誌, **6**, 10~14 (1965).
- 9) 吉武繁広, 赤塚慎一郎: New Food Industry **19**, 17~23 (1977).
- 10) Brumfitt, M., Wardlaw, A. C.: Nature **181**, 1783~1784 (1958).