

報 文

エタノール共存下におけるグリシンの大腸菌に対する抗菌作用

(平成10年11月6日受理)

胡 建 恩* 久留主泰朗* 堤 将 和*

Antibacterial Action of Glycine on *E. coli* in the Presence of Ethanol

Jianen Hu, Yasurou KURUSU and Masakazu TSUTSUMI

(School of Agriculture, Ibaraki University: 3-21-1, Amimachi-chuo,
Inashiki-gun, Ibaraki 300-0332, Japan)

The antibacterial action of glycine and some derivatives on *E. coli* was investigated in the presence of ethanol. (1) The growth of *E. coli* was inhibited by glycine and slightly by alanine, but not by glycinamide or sarcosine. (2) The activity of glycine was strong at low temperature (20°C) or at alkaline pH (pH 9.0), and weak at high temperature (40°C) or at acidic pH (pH 5.0). (3) Synergistic action of glycine and ethanol was observed. (4) *E. coli* cells were injured by glycine and/or ethanol, and their ability to form colonies on deoxycholate agar was lost. However, the colony-forming ability of the injured cells was restored by incubation in recovery broth. (5) Though the respiratory activity of the cells was inhibited by treatment with these chemicals, this activity was also restored when the injured cells were incubated in suitable broth. However, the mode of recovery of respiratory activity of the cells may be different from that of the colony-forming ability.

(Received November 6, 1998)

Key words: グリシン glycine; エタノール ethanol; 大腸菌 *E. coli*; 抗菌作用 antibacterial action; 損傷菌 injured cell; コロニー形成能 colony-forming ability; 呼吸能 respiratory activity

緒 言

グリシンは食品タンパク質を構成する一般的なアミノ酸であるが、抗菌力を有することで注目され¹⁾、実際に食品保存料として食品に添加されている。しかし、グリシンの抗菌力はそれほど強いものではなく、一般細菌に対する増殖阻止濃度は1%以上である¹⁾。そこで、グリシンと他の薬剤との併用が検討されたところ、併用効果が見られるいくつかの薬剤、すなわち、プロタミン²⁾、ポリリジン³⁾、エタノール⁴⁾、塩化ナトリウム⁵⁾、卵白リゾチーム⁶⁾が見いだされた。

一方、エタノールの抗菌力については古くから知られ、4~8%程度では増殖抑制的に⁷⁾、50%以上の高濃度ではおおむね殺菌的に⁸⁾作用する、と言われている。

なお、エタノールと他の薬剤との併用についてもいくつかの報告がある^{8)~10)}。例えば、清水らは *Bacillus subtilis* と *Proteus vulgaris* に対するエタノールとグリシンとの併用効果を検討し、増殖抑制効果があることを示した^{8), 9)}。しかし、抗菌機作について詳細な検討は行っていない。

本実験で用いられた大腸菌は食品の衛生指標細菌としても重要であるが、近年、大腸菌の一種である病原性大腸菌による食中毒が多発し、食品衛生学上大きな問題を提起している。しかし、非病原性大腸菌と病原性大腸菌とは病原性という観点から大きな違いがみられるが、放射線感受性¹¹⁾や薬剤感受性¹²⁾という点ではそれほど大きな違いはないといわれている。そこで、著者らは取り扱いが容易な非病原性大腸菌を用いてグリシンとエタノールとの併用作用機作について検討した。その結果、興味ある知見が得られたので報告する。

* 茨城大学農学部: 〒300-0332 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1

実験方法

1. 試薬類

グリシンやエタノール, その他の一般試薬は市販の特級品を用いた.

2. 供試菌

Escherichia coli IFO 3301 (以下, 大腸菌と略す)

3. 培地

Vschinsky 培地 (グリセリン 30 g, 乳酸アンモニウム 6 g, アスパラギン酸ナトリウム 3 g, リン酸二カリウム 1 g, 塩化カルシウム 0.1 g, 塩化ナトリウム 5 g, 硫酸マグネシウム七水和物 0.3 g, 水 1,000 mL, pH 7.0) を用いた (以下, V 培地と略す).

4. 接種菌液の調製

大腸菌保存菌株より釣菌して 10 mL の V 培地 (L 字試験管) に接種し, 30°C で一夜振とう培養 (60 r/min, 以下同じ条件) した. 次に, この培養液から 1 mL を取り, 9 mL の V 培地に注入し, 同様に培養して, 濁度 (OD₆₆₀) が 0.3 になった培養液 (対数期中期) を接種菌液とした.

5. 抗菌力の測定

V 培地 7.5 mL (L 字試験管) に指定された薬剤濃度になるようにグリシンあるいはエタノールを 1 mL (単独添加の場合) あるいは 2 mL (薬剤併用添加の場合はそれぞれを 1 mL) を加え, かくはん後接種菌液 0.5 mL, 必要に応じて滅菌水を加えて全量を 10 mL とし, 通常は 30°C で振とう培養した. なお, グリシン液は指定濃度の 10 倍に調製し, 常法に従って滅菌した. エタノール (99.5%) はあらかじめディメックス-13 (ミリポア) を用いてろ過 (除菌) して使用した. 菌の増殖は比色計 (Mini photo 518, タイテック) を用いて経時的に 660 nm の吸光度を測定し, その値から判定した.

グリシンあるいはエタノールの単独あるいは併用作用が静菌的であるのか, 殺菌的であるのかを検討するために次のような実験を行った. すなわち, 10 mL の接種菌液を遠心分離 (2,000 g, 10 分) して集菌した後, 滅菌水で洗浄後, 更に, 滅菌水 10 mL を加えて菌懸濁液を調製した. この菌懸濁液 1 mL を指定濃度の薬剤 9 mL に注入し, 30°C で 2 時間放置した後, これより 1 mL を取り, 9 mL の V 培地に添加して常法に従って培養した. 経時的に吸光度を測定し, 増殖の有無を指標として抗菌作用を判定した.

6. コロニー形成能の測定

大腸菌検索用培地としてデオキシコーレイト培地 (栄研化学) を使用した. 薬剤無処理区 (対照区) で形成されたコロニー数と薬剤処理区のコロニー数を計数し, 損傷菌数を推定した. なお, 対照区の菌は薬剤処理することなくデオキシコーレイト培地に混釈し, 37°C で 24 時間培養後, 形成されたコロニーを計数して対照区の菌数とした. 薬剤処理区は指定濃度の薬剤で 2 時間処理

した後, 対照区と同様に混釈し, 形成されたコロニーを計数した.

7. 損傷の回復実験

接種菌液 10 mL を遠心分離 (2,000 g, 10 分) して集菌し, 生理食塩水で 2 回洗浄後, 再び生理食塩水を加えて菌浮遊液を調製した. この菌浮遊液 2 mL に指定濃度の薬剤 3.3 mL (グリシン 1.5 mL, エタノール 1.8 mL) を加え, 全量を生理食塩水で 10 mL にした. この溶液を 30°C で 3 時間放置した. その後この液から 0.5 mL をとり, 栄養液 9.5 mL に注入した後同温度で 12 時間保温し, 損傷の回復を試みた. 栄養液としては 3 種, すなわち, V 培地と V 培地の有機成分のみの混合液, V 培地の無機成分の混合液の 3 種を準備した. 損傷回復処理終了後, デオキシコーレイト培地で形成されたコロニー数を算出し, その値から栄養液の損傷回復力を比較した.

8. 呼吸能の測定

呼吸能はメチレンブルーの脱色速度を測定することにより判定した¹³⁾. この際, メチレンブルー 32 mg を 1/15 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1,000 mL に溶解したものをメチレンブルー溶液とした. 呼吸能は次のようにして測定した. すなわち, 100 mL の接種菌液を遠心分離して集菌し, 沈殿部分に 40 mL の滅菌生理食塩水を加え, 菌浮遊液とした. この菌浮遊液 4 mL に 9% 塩化ナトリウム溶液 0.8 mL, 薬剤 3.3 mL (7. に同じ) を加え, 滅菌生理食塩水で全量を 10.0 mL とし, 30°C でゆるやかに振とうした. 2 時間後, この液にメチレンブルーを 4 mL, 流動パラフィン 1 mL を添加, 40°C で 15 分保温した後吸光度 (OD₆₆₀) を測定した.

9. 呼吸能の回復実験

薬剤で処理された大腸菌浮遊液を遠心分離 (2,000 g, 10 分) して集菌し, これに上記栄養液をそれぞれ加え呼吸能の回復を試みた. すなわち, これらの栄養液に大腸菌を浮遊させ, 30°C で 12 時間保温した後, 前項 (8.) に従って呼吸能を測定し, その値から菌の呼吸能の回復を評価した.

結果及び考察

1. グリシン並びにグリシン誘導体の抗菌力

グリシンの抗菌力発現の手掛かりを得るための一つの方法として, グリシン誘導体の抗菌力を比較検討した. 誘導体としてはグリシンのカルボキシル基をアミド化したグリシンアミド, グリシンの α 位の炭素の水素をメチル基で置換したアラニン, グリシンのアミノ基の水素をメチル基で置換したサルコシンの 3 種を用いた.

Fig. 1 から明らかなように, グリシンの抗菌力が最も強く, 次がアラニンであった. グリシンアミドとサルコシンの抗菌力は認められなかった. これらの結果から, グリシンの化学構造上の原子団 (基) と抗菌力発現とは密接に関連するものの, 抗菌力発現にかかわる原子

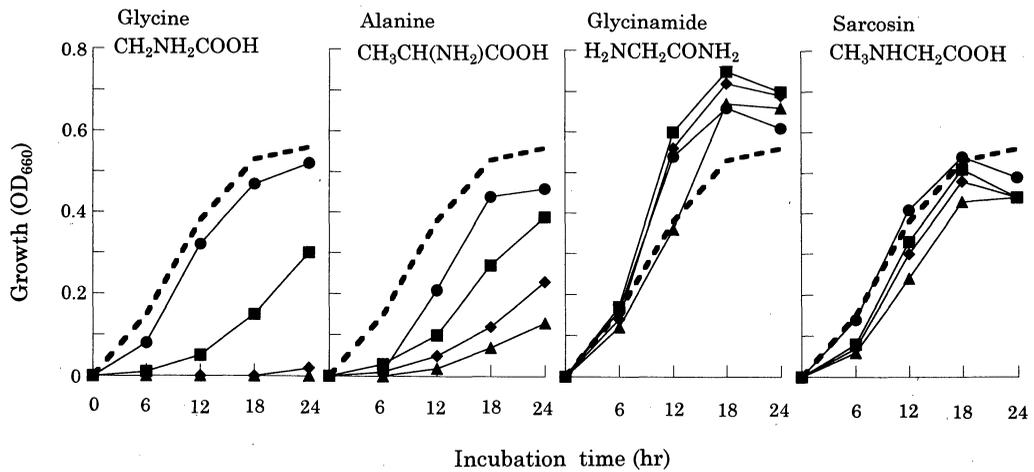


Fig. 1. Antibacterial activity of glycine derivatives against *E. coli*
 ---Control, —●—0.07 mol/L, —■—0.13 mol/L, —◆—0.20 mol/L, —▲—0.26 mol/L

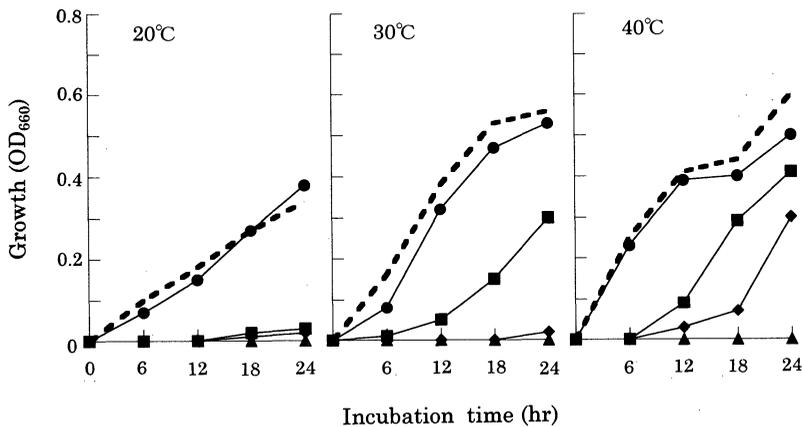


Fig. 2. Effect of temperature on the antibacterial activity of glycine
 ---Control, —●—0.07 mol/L, —■—0.13 mol/L, —◆—0.20 mol/L, —▲—0.26 mol/L

団を明らかにすることはできなかった。

なお、グリシンの大腸菌に対する抗菌力発現には 0.13 mol/L 以上の濃度を必要とした。この結果は駒形らの報告¹⁾ とほぼ一致した。

次に、グリシンの抗菌力発現に対する培養条件の影響について検討した。まず、グリシンの抗菌力発現に対する培養温度の影響を pH 7.0 で検討し、その結果を Fig. 2 に示した。

0.13 mol/L グリシンの抗菌力は 30°C と 40°C の培養温度で弱かったものの、20°C では強い抗菌力を示した。0.20 mol/L では 40°C でのみ増殖がみられた。このようにグリシンの抗菌力は培養温度に影響され、低温で強い抗菌力を発現した。

細菌の膜リン脂質の脂肪酸組成は培養温度によって変

化すると言われている。通常、低温培養すると融点の低い不飽和脂肪酸が増加し、高温培養では飽和脂肪酸が増加する¹⁴⁾。この変化は膜透過性にも影響する¹⁵⁾。本実験においても、培養温度の違いによって本菌のグリシン感受性に違いがみられた。前述したことを考えると、この原因の一つとして菌体膜の性状の違いが推定される。この点については今後膜脂質の分析などを行い、より詳細に検討したいと考えている。

次に、グリシンの抗菌力発現に対する培地の pH の影響を培養温度 30°C で検討し、その結果を Fig. 3 に示した。

本菌は pH 5.0 で若干増殖の遅れがみられたが、対数期以降はほぼ正常に増殖した。なお、酸性側と中性で 0.07 mol/L グリシンの抗菌力はほとんど認められな

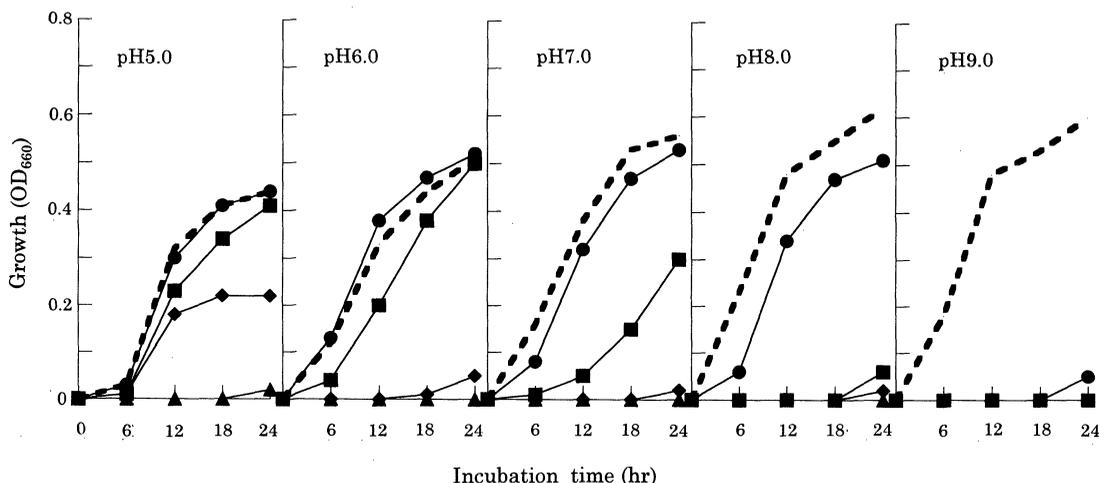


Fig. 3. Effect of pH on the antibacterial activity of glycine

---Control, —●—0.07 mol/L, —■—0.13 mol/L, —◆—0.20 mol/L, —▲—0.26 mol/L

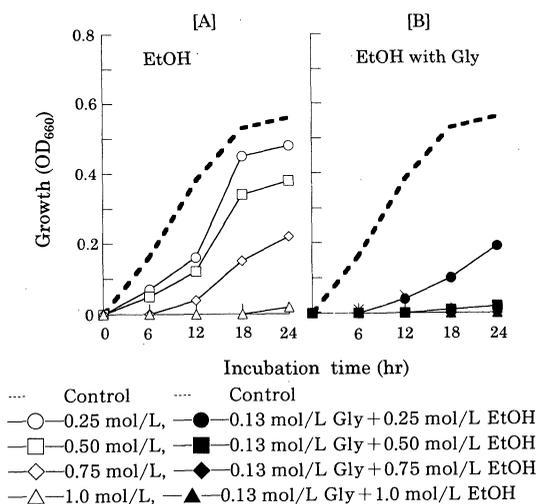


Fig. 4. Antibacterial activity of ethanol in the presence of glycine

かったが、pH 8.0 ではわずかに、pH 9.0 では強い抗菌力がみられた。グリシンの濃度を更に高めると、この傾向はいちだんと顕著になった。このように、グリシンの抗菌力はpHによって変わり、酸性側で弱く、アルカリ性側で強いことが分かった。抗菌力発現においてpHの影響を受ける薬剤がある。例えば、安息香酸のような酸型保存料はpHが高くなると解離して抗菌力が低下するが、パラオキシ安息香酸エステルのように解離しないものはpHの影響を受けない。プロタミンのような塩基性ポリペプチドの抗菌性もpHの影響を受ける¹⁶⁾。グリシンも両性電解質であるのでpHの影響を受けると考えら

れるが、アミノ酸の中でグリシンだけが特に強い抗菌力を示すことを考えると、両性電解質というアミノ酸共通の特性で抗菌性を説明することはできない。したがって、現在のところグリシンの抗菌性がなぜpHの影響を受けるかについては明らかではない。また、このことに関する報告も見当たらない。今後の検討課題であろう。

2. グリシンとエタノールの併用効果

エタノールは安全性の高い消毒液として食品工業でも多用され、また、食品保存料として、あるいは、調味を目的として食品に添加されることもある。そこで、大腸菌に対するグリシンとの併用効果をpH 7.0、培養温度30°Cで検討した。

Fig. 4の[A]から明らかなように、エタノール単独で大腸菌の増殖を完全に阻止するためには、1 mol/L以上の濃度が必要であった。しかし、グリシンを0.13 mol/L添加した場合、エタノールの増殖阻止濃度は0.5 mol/Lとなった(Fig. 4の[B])。なお、グリシンも0.13 mol/Lでは大腸菌の増殖を完全に阻止できない(Fig. 1)ことを考えると、グリシンとエタノールは強い併用効果を示すと言える。

3. 併用薬剤の抗菌性

併用薬剤の抗菌性を明らかにすることは、実用化において、あるいは、抗菌機作を解明する際重要な手掛かりとなる。そこで、あらかじめ薬剤で処理した菌の生残性について検討した。

Fig. 5の(A)にはグリシン単独で処理した菌、(B)にはエタノール単独処理、(C)にはこれらの薬剤による併用処理した菌の生残性を示した。これらの結果から明らかなように、高濃度薬剤単独処理の場合でも菌は生残していた。また、高濃度薬剤併用処理の場合も菌は死滅し

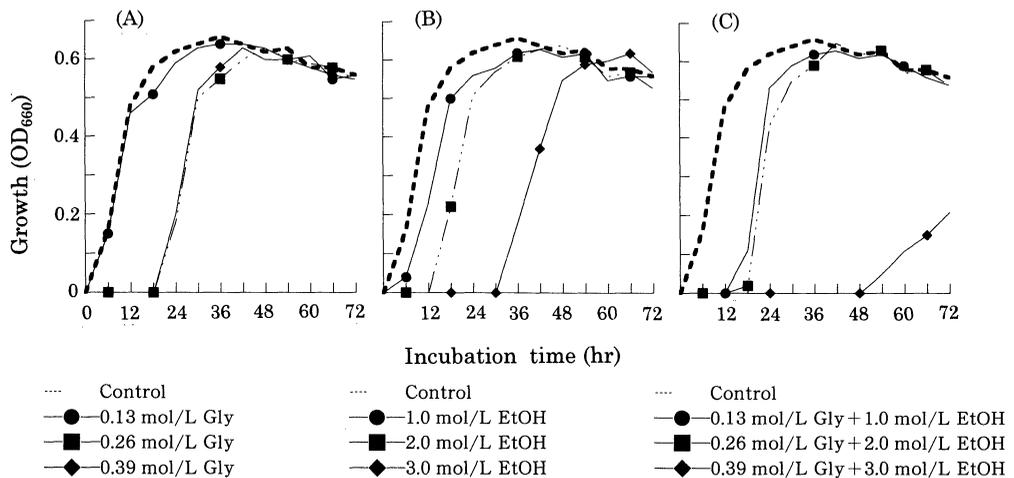


Fig. 5. Effect of glycine and/or ethanol on the survivals of *E. coli*

After *E. coli* cells were treated with chemicals at 37°C for 24 hr, harvested and suspended in sterile water, the cell suspension was inoculated into Vschinsky broth and the growth was measured.

Table 1. Colony-forming Ability of *E. coli* Treated with Glycine and/or Ethanol

Chemicals	Colony counts/mL
Control	5.8×10^5
0.13 mol/L Gly	1.7×10^5
0.26 mol/L Gly	4.0×10^4
0.39 mol/L Gly	0
1.0 mol/L EtOH	4.6×10^5
2.0 mol/L EtOH	1.4×10^4
3.0 mol/L EtOH	0
0.13 mol/L Gly + 1.0 mol/L EtOH	1.2×10^4
0.26 mol/L Gly + 2.0 mol/L EtOH	9.0×10^2
0.39 mol/L Gly + 3.0 mol/L EtOH	0

Gly: Glycine, EtOH: Ethanol

Cells were treated with chemicals at 30°C for 24 hr. and the samples were plated on selective medium (Deoxycholate agar). The plates were incubated overnight at 37°C and the resulting colonies were counted.

なかった。これらの結果から、本実験条件下での薬剤の抗菌性はそれほど強いものではないと判断した。

4. 薬剤処理された大腸菌のコロニー形成能

エタノール共存下においてグリシンの抗菌力は増強されたが、その作用は弱いものであった。このことから、これらの薬剤の作用点は恐らく菌体膜であろうと推察した。通常、菌体膜が損傷すると選択培地でのコロニー形成能が抑制される¹⁶⁾。そこで、デオキシコレーイト培地

を用いて、薬剤処理された菌のコロニー形成能を測定した。

Table 1 に示すように、対照区のコロニー形成数を 1 mL 当たり 5.8×10^5 個とした。薬剤単独で処理した菌のコロニー形成能はいずれも対照区より低下し、高濃度では全くコロニーを形成しなかった。両薬剤併用処理の場合コロニー数は更に減少し、単独処理の場合より損傷の程度がより大きくなったことが推定された。これらの結果から、これらの薬剤の作用点の一つは菌体膜と推定された。この点を更に確かめるために以下の実験を行った。

5. 損傷菌の回復

Fig. 5 で示したように、高濃度の両薬剤で処理された菌でも、長時間 V 培地で保温すると損傷が回復し、菌の増殖がみられるようになった。このことは V 培地成分中に損傷回復に必要な成分が含まれていることを示す。そこで V 培地中のどのような成分が損傷回復に有効であるかを検討した。

対照区のコロニー形成数を 1.0×10^8 個とした。Table 2 から明らかなように、高濃度薬剤単独処理のコロニー数は著しく減少した。両薬剤の併用処理区では全くコロニーの形成がみられなかった。次に、V 培地の成分を大きく無機栄養成分と有機栄養成分に区分し、これらの成分区による回復実験を試みた。まず、V 培地での回復を検討した。その結果、0.39 mol/L グリシン処理区のコロニー数は対照区に比べやや減少し、V 培地処理によってほぼ同数に回復したが、損傷の回復といえるかどうか明確ではなかった。3.0 mol/L エタノールの場合、著しい菌の損傷が推定されたが、V 培地処理

Table 2. Recovery of Chemically Injured *E. coli* in Various Broth

Chemicals	After treated	Colony counts/mL					
		Suspending broth					
		VM	MN	ON	AL	SA	Gc
Control	1.0×10^8	1.0×10^9	1.5×10^7	1.8×10^7	5.0×10^6	2.0×10^7	3.4×10^5
0.39 mol/L Gly	1.5×10^6	1.0×10^9	1.0×10^6	1.3×10^7	4.5×10^6	1.0×10^7	1.9×10^5
3.0 mol/L EtOH	5.0×10	1.7×10^3	0	1.5×10^3	1.0×10^2	4.6×10^2	0
0.39 mol/L Gly + 3.0 mol/L EtOH	0	1.0×10^3	0	8.0×10^2	5.0×10	1.0×10^2	1.0×10

VM: Vschinsky broth, MN: mineral broth, ON: organic broth

The composition of mineral broth was K_2PO_4 , 0.1%; $CaCl_2$, 0.01%; NaCl, 0.5%; $MgSO_4$, 0.03%, and that of organic broth was ammonium lactate (AL), 0.6%; sodium aspartate (SA), 0.3%; Glycerin (Gc), 3.0%. Vschinsky broth contain all these substances.

Selective medium: See Table 1

Cells were treated with chemicals at 30°C for 3hr. The injured cells were incubated in each of the suspending broth at 30°C for 12 hr, and then, each suspension was plated on the selective medium and the resulting colonies were counted.

Table 3. The Respiratory Activity of *E. coli* Injured by Glycine and/or Ethanol

Chemicals	Respiratory activity (%)
Control	100
0.13 mol/L Gly	100
1.0 mol/L EtOH	0
0.13 mol/L Gly + 1.0 mol/L EtOH	0
0.39 mol/L Gly	0
3.0 mol/L EtOH	0
0.39 mol/L Gly + 3.0 mol/L EtOH	0

Experimental conditions: See Table 2

Respiratory activity was measured with the guidance of the decolorization rate of methylene blue.

で損傷の回復が図られるものと思われた。両薬剤併用処理の場合も同じように考えられる。次に、無機栄養成分区と有機栄養成分区における回復力を比較した。無機栄養成分区ではエタノール単独処理あるいは両薬剤併用処理で全く回復がみられなかった。これに対して、有機栄養成分区での回復力はいずれの薬剤処理区においても回復力がみられた。更に、有機栄養成分区の中のどのような成分が有効であるかを検討した結果、いずれの損傷に対しても乳酸アンモニウムとアスパラギン酸ナトリウムが有効であった。グリシンによる損傷に対してはグリセリンも有効であった。これらの結果から、これら薬剤による損傷の回復には、有機態窒素成分が必要なのかもしれない。なお、このことは菌体膜を構成しているタンパク質成分や酵素系の修復を示唆しているものと思われる。一方、グリシンによる損傷の場合はグリセリンでも効果

があったことから、エネルギー生産系の関与も示唆されるが、明確な結論をだすには今後さらなる検討が必要と思われる。

6. 呼吸阻害

細菌の呼吸系器官として菌体膜は重要である。特に、本実験で用いられた薬剤による損傷あるいは回復実験において、薬剤の作用点として菌体膜が推定された。また、細菌の場合、呼吸系酵素は膜結合タンパク質として存在するものも多い。そこで、メチレンブルーの脱色能を指標として、薬剤の呼吸阻害を測定した。

Table 3 から明らかなように、0.13 mol/L グリシンによる呼吸阻害はみられなかったが、高濃度 (0.39 mol/L) グリシンでは 100% 阻害された。エタノールでは 1.0 mol/L 以上で 100% 阻害された。併用した場合も当然ながら完全に阻害された。

7. 呼吸阻害の回復

呼吸阻害が認められた試験区について呼吸回復実験を行った。回復のための栄養成分としては V 培地と V 培地の有機栄養成分を用いた。薬剤処理は呼吸阻害がみられた濃度で実施した。

Table 4 に示すように、1.0 mol/L エタノールによる呼吸阻害は、V 培地と有機栄養成分混合液でほぼ完全に回復し、乳酸アンモニウム単独でも効果があった。しかし、アスパラギン酸ナトリウムとグリセリンでは回復しなかった。一方、0.13 mol/L グリシンと 1.0 mol/L エタノール混液処理菌 (低濃度混液処理菌) は V 培地、有機栄養成分混合液、乳酸アンモニウム単独、グリセリン単独で回復した。この場合、0.13 mol/L グリシンはエタノールの呼吸阻害を軽減するように作用したとも解釈できるが、詳細な機作は分からない。今後詳細に検討したいと考えている。0.39 mol/L グリシン単独処理菌

Table 4. Recovery of the Respiratory Activity of Injured *E. coli* in Various Broth

Chemicals	Respiratory activity (%)				
	Suspending broth				
	VM	ON	AL	SA	Gc
1.0 mol/L EtOH	93	90	81	0	0
0.13 mol/L Gly+1.0 mol/L EtOH	88	87	88	0	85
0.39 mol/L Gly	92	91	88	0	58
3.0 mol/L EtOH	0	0	0	0	0
0.39 mol/L Gly+3.0 mol/L EtOH	12	11	11	0	0

Abbreviations: See Table 2

Experimental conditions: See Table 2

の呼吸回復は低濃度混液処理菌と同様であったが、グリセリン単独の回復効果はやや低下した。3.0 mol/L エタノール処理菌の呼吸はすべての試験区で回復しなかったが、0.39 mol/L グリシンと3.0 mol/L エタノール混液処理菌は低濃度混液処理菌の場合と同様 V 培地並びに有機栄養成分混合液、乳酸アンモニウム単独でわずかに呼吸回復がみられた。アスパラギン酸ナトリウム単独ではすべての試験区で呼吸回復がみられなかった。これらの結果から、エタノールはグリシンよりも呼吸に対する障害が強く、その分有機栄養成分による回復機作も複雑であるように思われる (Table 3 と Table 4)。

グリシンとエタノールによる呼吸障害並びに呼吸障害回復実験の結果はコロニー形成能の障害並びに回復実験の結果と明らかに異なることから、コロニー形成能障害と呼吸障害とは異なる作用機作と思われる。したがって、大腸菌に対するこれらの薬剤の作用点は菌体膜のある特定の共通部位ではなく、それぞれ異なった非特異的部位への作用と考えられる。また、本実験条件下におけるこれらの薬剤による増殖障害は非致死的作用の総和として発現されたものと思われる。

まとめ

エタノール共存下、大腸菌 (IFO 3301) に対するグリシンの抗菌作用について検討した結果、下記のような知見が得られた。

1. グリシン誘導体の中ではグリシンの抗菌力が最も強く、次がアラニンであった。グリシンアミドとサルコシンの抗菌力は認められなかった。
2. グリシンは低温で、かつ、アルカル性側で強い抗菌力を示した。
3. エタノール共存下、グリシンの抗菌力は著しく増大した。しかし、本実験条件下、その作用はそれほど強いものではなかった。
4. グリシンとエタノールの併用により、本菌は損傷を受け、デオキシコーレイト培地上でのコロニー形成能は著しく阻害されたが、Vschnisky 培地や本培地の有機栄養成分混合液あるいは個々の有機栄養

成分中でその損傷は回復した。

5. グリシンとエタノールは本菌の呼吸能を著しく阻害したが、4. と同様の栄養成分中で呼吸能の回復がみられた。しかし、コロニー形成能が回復したアスパラギン酸ナトリウムによる呼吸能の回復は認められなかった。

以上の結果から、エタノール共存下、グリシンの本菌に対する主な作用部位は菌体膜であろうと推定した。

文 献

- 1) Komagata, K., Ogawa, H., Fukushima, K., Ito, T., Inhibitory effect of glycine on microorganism. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **9**, 289-294 (1968).
- 2) Akatsuki, H., Purotamin (seizai) No Shokuhin Eno Ohyou. *New Food Industry Japan*, **33**, 25-29 (1991).
- 3) Fujii, M., Sindou, T., Hozonryou Tositenno Poririjin No Riyou. *New Food Industry Japan*, **32**, 111-117 (1990).
- 4) Tsutsumi, M., Lee, J. K., Pasteurization in the presence of glycine, sodium chloride and ethyl alcohol. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**, 545-551 (1988).
- 5) Lee, J. K., Tatsuguchi, K., Tsutsumi, M., Watanabe, T., Combined antimicrobial effect of glycine and several reagents. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **26**, 279-284 (1985).
- 6) Yositate, S., Toufu No Hinshitu Hoji Ni Kansuru Mondaiten To Sono Taisaku. *New Food Industry Japan*, **19**, 19-23 (1977).
- 7) Haruta, M., Utagawa, S., Yokoyama, R., "Saisin Shokuhin Biseibutu Seigyo Sisutemu Deitashu", Tokyo, Japan. *Science Forum*, 1983, p. 460-480.
- 8) Shimizu, Y., Furuhashi, K., Hasegawa, K., Tatino, S., Japan Kokai Tokkyo Koho, Showa, 55-2247.
- 9) Shimizu, Y., Furuhashi, K., Hasegawa, K., Tatino, S., Japan Kokai Tokkyo Koho, Showa, 53-28458.
- 10) Kato, H., Yamazawa, M., *Shokuhin Eno Arukoru Riyou Ni Kansuru Kenkyu*. Aichiken Shokuhin Kou-

- gyou Shikenjo Nempou, **12**, 111-117 (1971).
- 11) Kimura, S., Taimatu, A., Daichoukin O157:H7 No Houshasen Kanjusei. Boukin Boubai (J. Antibact. Antifung. Agents), **25**, 413-416 (1997).
 - 12) Imai, K., Ohotani, H., Ishigaki, S., Moriyama, T., Hioki, Y., Watanabe, K., Byougensei Daichoukin O157 Ni Taisuru Shihan Sakkin Shoudokuzai No Sakkin Kouka. Boukin Boubai (J. Antibact. Antifung. Agents), **25**, 127-129 (1997).
 - 13) De Wever, H., De Moor, K., Verachtert, H., Toxicity of 2-mercaptobenzothiazole toward bacterial growth and respiration. Appl. Microbiol. Biotechnol., **42**, 631-635 (1994).
 - 14) Deene, L. L. M., Chemistry of phospholipids in relation to biological membranes. Pure and Applied Chemistry, **25**, 25-56 (1971).
 - 15) Tsutsumi, M., Oyama, Y., Suda, I., Watanabe, T., Action of some detergents on succinate dehydrogenase of *E. coli in vivo*. Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ., **35**, 89-95 (1981).
 - 16) Haruta, M., Udagawa, S., Yokoyama, R., "Saishin Shokuhin Biseibutu Seigyo Shisutemu Deitashu". Tokyo, Japan. Science Forum, 1983, p. 151-165.